

ALINE VIANA BEDNASKI

AVALIAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO E PROTEICO E CARACTERIZAÇÃO DOS
HEMÓCITOS DA HEMOLINFA DE ARANHA MARROM (*Loxosceles
intermedia*)

CURITIBA
2013

ALINE VIANA BEDNASKI

AVALIAÇÃO DO PERFIL LIPÍDICO E PROTEICO E CARACTERIZAÇÃO DOS
HEMÓCITOS DA HEMOLINFA DE ARANHA MARROM (*Loxosceles
intermedia*)

Dissertação apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e
Molecular, no Curso de Pós-Graduação em Biologia
Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, da
Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Andrea Senff Ribeiro

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Olga Meiri Chaim

CURITIBA

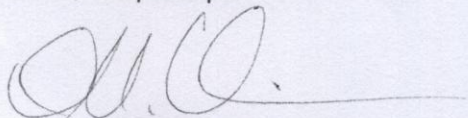
2013

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

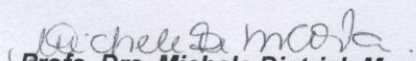
Departamento de Biologia Celular e Departamento de Fisiologia
Setor de Ciências Biológicas/ Universidade Federal do Paraná
Instituto Carlos Chagas (ICC/FIOCRUZ)

PARECER

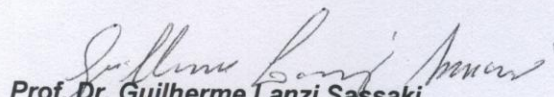
A banca examinadora, instituída pelo colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná, composta por:



Profa. Dra. Olga Meiri Chaim
Orientadora e presidente da banca
Universidade Federal do Paraná



Profa. Dra. Michele Dietrich Moura Costa
Universidade Estadual de Ponta Grossa - UEPG



Prof. Dr. Guilherme Lanzi Sassaki
Universidade Federal do Paraná - UFPR

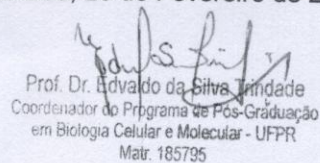
Suplente:

Profa. Dra. Lia Sumie Nakao
Universidade Federal do Paraná - UFPR

Após arguir a mestrande **Aline Viana Bednaski**, em relação ao seu trabalho intitulado: "Caracterização bioquímica e biológica da hemolinfa de aranha-marrom (*Loxosceles intermedia*)", são de parecer favorável à **APROVAÇÃO** da acadêmica, habilitando-a ao título de MESTRE em Biologia Celular e Molecular, área de concentração Biologia Celular e Molecular.

A obtenção do título está condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da banca examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 28 de Fevereiro de 2013



Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
em Biologia Celular e Molecular - UFPR
Matr. 185795

Dedico esse trabalho aos meus pais, pois sem o esforço, dedicação e amor deles minha formação não seria possível. À minha mãe Nilda e ao meu pai Francisco que possuem toda minha admiração, respeito e amor.

AGRADECIMENTOS

A Deus que nos deu o dom da vida, pela proteção diária, por nos presentear com a inteligência e nos dar a graça para alcançarmos nossos objetivos. A Ele cabe o louvor e a glória, a nós o agradecer.

Aos meus pais Nilda Gomes Viana Bednaski e Francisco Pereira Bednaski, pelo amor incondicional, por terem cativado e apoiado meus estudos, por transmitirem suas experiências de vida, por terem paciência a me ensinar a lidar com os momentos difíceis longe da família.

À minha avó Ircelina Gomes Viana “Dona Nega” por ser sempre carinhosa mesmo não entendendo por que tive que estudar tão longe de casa. Ao meu irmão Adriano Viana Bednaski por cuidar de mim, me ensinar as malandragens da vida e me ensinar que as decepções amorosas não podem atrapalhar na vida profissional.

À minha tia Eva Bednasky e minha prima Karime Bednasky que me receberam em sua casa e me ajudaram a entender como funciona Curitiba. Sem vocês eu não teria um lar aconchegante para morar.

Às minhas tias Juraci Teixeira, Zófia Bednaski e Carla Viana, às minhas primas Renata Teixeira, Thatiana Viana e Patrícia Viana, aos meus primos José Roberto Teixeira Júnior, Jonas Pesente e Ronaldo Pesente, à minha afilhada Marina Teixeira e ao meu tio Edson Viana, pela torcida e orações de vocês.

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Andrea Senff-Ribeiro, por ter acreditado no meu potencial e ter me acolhido mesmo sem me conhecer, pela sua dedicação em ensinar a ser uma profissional responsável, confiável e acima de tudo uma grande mãe e mulher.

À minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Olga Meiri Chaim por sempre estar disposta a escutar nossos problemas científicos (ou não) e nos aconselhar da forma mais amigável possível, pelo seu exemplo dedicação a pesquisa, pelo companheirismo, pelas caronas sempre bem vindas e divertidas, pela sua prontidão em me apresentar o Prof. Marcos, e me ajudar nos experimentos em São Paulo.

Ao Prof. Dr. Silvio Sanches Veiga pelo exemplo de profissionalismo, por financiar nossas loucuras científicas, por me receber de portas abertas no seu grupo de pesquisa e acreditar no meu trabalho.

À Dr^a. Luiza Helena Gremski pela sua paciência, por nos transmitir tranquilidade e sempre ter uma sugestão criativa para nossos problemas científicos.

Às minhas melhores amigas Dilza Trevisan Silva e Marianna Boia Ferreira, agradeço à vocês pela cumplicidade, pela amizade, pelo carinho com que me receberam em seus corações. À vocês que me ensinaram o que é amizade de verdade, me ensinaram ciência e muitas outras coisas. Meus dias são mais felizes com tenho vocês ao meu lado.

Ao meu querido amigo Fernando Hitomi Matsubara “Zé” por sempre rir das minhas piadas, por compartilhar os bons filmes e músicas e pela ajuda na identificação dos hemócitos.

À amiga Valéria Ferrer pela sensibilidade em perceber meus sentimentos, pela amizade e por financiar o livro de hemócitos.

Às minhas amigas de Campo Grande: Muryel de Barros “Kid”, Ana Paula Machado “Polenta”, Priscila Funes “Pri” e Juliana Maravieski “Ju”, pela indiscutível amizade e apoio de vocês.

À grande família LME: Larissa Vuitika, Matheus Belisário, Adriano Morgon, Thiago de Mari, Gabriel Meissner, Kiane da Silva, Eduardo Soares, Eduardo Lopes, Fernanda Souza, Mariana Magnoni, Lucas Pedrosa, Daniela Buch, Daniele Moreira, Ana Carolina Wille, Brenda Marin, João Scandelari e Marta Oliverio “Marta Maria” que me apresentou aos mistérios da hemolinfa. Agradeço a essa família pela recepção calorosa, pelos ensinamentos científicos e pela colaboração de todos.

Aos colegas do laboratório de neurobiologia do departamento de patologia básica - UFPR, em especial Marcia Helena Appel, Chelin Auswald Steclan e Beatriz Essenfelder Borges.

À Herculano Salviano dos Reis Filho “seu Nino” pela paciência, pelas sugestões e ajuda com as lâminas de hemócitos.

Ao Prof. Dr. Marcos Sergio de Toledo (UNIFESP) por financiar as HPTLCs, por me ensinar a trabalhar e interpretar os resultados de lipídios, e por me transmitir o fascínio que é trabalhar com essas moléculas.

À Prof^a. Dr^a. Almeriane Maria Weffort Santos por gentilmente permitir a utilização da citocentrífuga e pela atenção com os meus resultados.

À Marlene Camargo, secretária do programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular e Mirian Maciel, secretária do departamento de Biologia Celular.

Aos queridos porteiros do Setor de Ciências Biológicas, Sebastião Figueiredo “seu Tião” e Luiz Ferraz “seu Luiz” que sempre nos oferecem um saudoso bom dia ou um até logo.

À coordenação e ao colegiado e do Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Molecular.

À CAPES, Fundação Araucária, FAPESP, SETI, CNPq pelo apoio financeiro.

À todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para realização desse trabalho.

Muito Obrigada!

RESUMO

No Paraná, ocorrem apenas quatro espécies de aranhas do gênero *Loxosceles*: *L. gaucho*, *L. laeta*, *L. hirsuta* e *L. intermedia*, sendo essa última espécie a mais abundante em Curitiba-PR e região metropolitana. Essas aranhas também são conhecidas como aranhas-marrons devido a sua coloração que varia de marrom claro a marrom escuro. Atualmente, acidentes com aranha-marrom é um problema de saúde pública devido aos inúmeros casos de envenenamento. O veneno dessas aranhas já foi caracterizado e diversas toxinas foram estudadas. Contudo, a hemolinfa de *Loxosceles* nunca foi pesquisada e de forma geral a hemolinfa de artrópodes é pouco investigada. Hemolinfa de diferentes animais tem sido alvo de estudos que envolvem diversas aplicações biotecnológicas, tais inibição de proteases e aplicação dos peptídeos antimicrobianos nas áreas médicas. Portanto, esse trabalho teve como objetivo determinar as características bioquímicas e biológicas da hemolinfa da aranha-marrom *L. intermedia*. A hemolinfa de *L. intermedia* apresentou um perfil proteico com amplo espectro de proteínas. O componente proteico mais representativo foi identificado na região de 66 kDa. Alguns autores mostraram que essa região refere-se às subunidades de hemocianina, que é a proteína mais abundante na hemolinfa dos artrópodes. Além disso, o perfil proteico apresentou outras duas bandas bem características da hemolinfa de outros artrópodes em 116 e 97 kDa. O perfil em gel 2D revelou que as proteínas totais da hemolinfa de *L. intermedia* estão distribuídas principalmente na faixa de pH ácido e neutro. A análise lipídica da hemolinfa foi realizada através de HPTLC e foram identificados fosfolipídios como fosfatidilcolina, fosfatidil-inositol e fosfatidiletanolamina. Os esteróis identificados nesse trabalho foram colesterol, ergosterol e triacilglicerol; e não foram identificados glicolipídios. O perfil de glicosilação proteica foi avaliado através de *Lectin Blot* e as proteínas totais da hemolinfa de *L. intermedia* apresentaram resíduos de alta manose e N-acetilglucosamina. Não foram identificados resíduos de ácido siálico, corroborando com dados de glicosilação de toxinas do veneno dessa mesma aranha. Através de microscopia de luz foram identificados pró-hemócitos, que são células precursoras dos outros tipos celulares. Também foi constatada a presença de plasmatócitos e granulócitos, que são células envolvidas na imunidade inata, realizando fagocitose, nodulação, encapsulação e melanização. Esse trabalho foi o primeiro a estudar a hemolinfa da aranha-marrom caracterizando o perfil proteico, lipídico e de glicosilação de seus componentes. Além disso, a fração celular também foi investigada e diferentes hemócitos identificados. Dessa forma esse estudo inicia uma nova linha de pesquisa no estudo de *Loxosceles*, ampliando o conhecimento e as fontes naturais de moléculas bioativas com potenciais biotecnológicos.

Palavras-chave: *L. intermedia*, hemolinfa, perfil proteico, perfil lipídico e hemócitos.

ABSTRACT

In Paraná there are only four species of *Loxosceles* spiders: *L. gaucho*, *L. laeta*, *L. hirsuta* e *L. intermedia*, being the last one more abundant in Curitiba and metropolitan region. *Loxosceles* spiders are commonly known as brown spiders regarding their body color which ranges from a fawn to dark brown. The current increasing number of envenomations after brown spider accidents is a problem of public health. Venom from these spiders has already been characterized and a great number of toxins have been studied. However, *Loxosceles* hemolymph has never been investigated; and in general, hemolymph from arthropods are poorly studied. Hemolymphs from distinct animals have been focus of studies concerning biotechnology applications, such as inhibition of proteases and application of the antimicrobial peptides in the medical. Thus, this work aimed the determination of biochemical and biological characteristics of the hemolymph from *L. intermedia* brown spider. The protein profile of *L. intermedia* hemolymph presented a broad range of proteins. The major proteic component was detected at 66 kDa region. Some authors showed that this region is rich in hemocyanin subunits and that this protein is the most abundant component in arthropods hemolymph. Furthermore, the protein profile depicted two other bands, which are hallmarks in other arthropods hemolymph, in 116 and 97 kDa. The bidimensional protein profile showed that hemolymph proteins from *L. intermedia* are mainly distributed among acid to neutral pH. Lipid analysis was performed by HPTLC technique and several phospholipids were identified, such as phosphatidylcholine, phosphatidylinositol and phosphatidylethanolamine. Sterols identified in this work were cholesterol, ergosterol and triacylglycerol, and no glycolipids were identified. Protein glycosylation profile was evaluated by Lectin Blot assays and only high manose and N-acetylglucosamine residues were identified. Sialic acid residues were not found, corroborating with *L. intermedia* glycosylation data obtained using venom toxins. Using light microscopy analysis, phohemocytes were identified, which are the precursor cells. Plasmacytes and granulocytes were also detected, these cells are involved in innate immunity, acting in phagocytosis, nodulation, encapsulation and melanization. This work was the first one to study the brown spider hemolymph, characterizing the protein, lipid and glycosilation profiles of its components. Furthermore, the cellular fraction was also investigated and different hemocytes were identified. Thereby, this study starts a new research line in *Loxosceles* field, extending the knowledge and the natural source of bioactive molecules with biotechnological potentials.

Key-words: *L. intermedia*, hemolymph, proteic profile, lipid profile and hemocyte.

LISTA DE ABREVIATURAS

AD: Adipohemócito
AMP: Peptídeos Antimicrobianos
APS: Persulfato de amônio
BCIP: 5-bromo-4cloro-3-indoil fosfato
BSA: Albumina de soro bovino
CDH : Ceramida Dihexosil
CIP: do inglês, *Protease inhibitor cocktail for mammalian tissues*
CMH: Ceramida Monohexosil
COL : Colesterol
CTH: Ceramida Trihexosil
DSA: *Datura stramonium agglutinin*
DTT: Ditioneitol
EF: Esferulócitos
ERG : Ergosterol
GGS: Gangliosídios
GL: Granulócitos
GLOBO: Globosídeos
GNA: *Galanthus nivalis agglutini*
HDL: do inglês, *High Density Lipoprotein*
HPTLC: do inglês, *High Performance Thin Layer Chromatography*
IgG: Imunoglobulina do Tipo G
LDL: do inglês, *Low Density Lipoprotein*
MALDI-TOF-MS: do inglês, *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight-Mass Spectrometry*
MDCK: do inglês, *Madin-Darby canine kidney epithelial cell line*
MERS: Hexâmeros simples
MET: Microscopia eletrônica de transmissão
MGG: May-Grunwald Giemsa
MTBE: *Methyl Tert Butyl Ether*
nm: Nanometro
OE: Oenocitóide

PAS: do inglês, *Periodic acid-Schiff*

PC : Fosfatidilcolina

PE : Fosfatidiletanolamina

pH: Potencial hidrogeniônico

PI: Fosfatidil-inositol

pl: Ponto isoelétrico

PL: Plasmatócitos

PNA: *Peanut agglutinin*

PH: Pro-hemócitos

PS : Fosfatidilserina

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

SF-9: Célula de *Spodoptera frugiperda*

SNA: *Sambucus nigra agglutini*

TAG: Triacilglicerol

TEMED: N,N,N',N'- tetrametil-etilenodiamina

TLC : do inglês, *Thin-Layer Chromatography*

v/v: Proporção volume/volume

V: Voltagem

VHDL: do inglês, *Very High Density Lipoprotein*

2D: Gel Bidimensional

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 ARTRÓPODES.....	18
2.1.1 ARTRÓPODES VENENOSOS	19
2.2 HEMOLINFA.....	21
2.3 PROTEÍNAS PRESENTES NA HEMOLINFA DOS ARTRÓPODES.....	22
2.3.1 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS PROTEÍNAS DOS ARTRÓPODES.....	24
2.3.2 HEMOCIANINA	27
2.4 COMPOSIÇÃO DE LIPOPROTEÍNAS E LIPÍDIOS NA HEMOLINFA DOS ARTRÓPODES	30
2.5 COMPOSIÇÃO CELULAR DA HEMOLINFA DOS ARTRÓPODES	32
2.6 ARANHAS DA ESPÉCIE <i>Loxosceles intermedia</i>	34
3. OBJETIVOS	38
3.1 OBJETIVO GERAL	38
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	38
4. MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1 OBTENÇÃO DA HEMOLINFA.....	39
4.2 OBTENÇÃO DA HEMOLINFA LIVRE DE CÉLULAS.....	39
4.3 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS (SDS-PAGE).....	40
4.4 GEL DE BIDIMENSIONAL (2D)	40
4.5 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE GLICOSILAÇÃO DA HEMOLINFA DE <i>L. intermedia</i>	43
4.6 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE ALTA RESOLUÇÃO.....	44
4.7 PREPARAÇÃO DAS LAMINAS PARA IDENTIFICAÇÃO DOS HEMÓCITOS.....	46
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1 PADRONIZAÇÃO E ESTABELECIMENTO DO MÉTODO DE COLETA DE HEMOLINFA DE <i>Loxosceles intermedia</i>	48
5.2 PERFIL PROTEICO DA HEMOLINFA DE <i>L. intermedia</i>	51
5.3 PERFIL PROTEICO DA HEMOLINFA DE <i>L. intermedia</i> EM GEL BIDIMENSIONAL (2D)	55
5.4 PERFIL DE GLICOSILAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA HEMOLINFA DE <i>L. Intermedia</i> COM <i>Lectin-Blot</i>	62
5.5 PERFIL LIPÍDICO DA HEMOLINFA DE <i>L. intermedia</i>	65
5.6 CARACTERIZAÇÕES DOS HEMÓCITOS	71
6. CONCLUSÕES.....	82

REFERÊNCIAS.....	83
ANEXO 1	96

1. INTRODUÇÃO

Os artrópodes são animais capazes de habitar os mais diversos ambientes como o terrestre, o aquático ou o aéreo (RUPPERT *et al.*, 2005). Obtiveram sucesso aqueles que possuíam mecanismos de sobrevivência e reprodução que superassem as pressões seletivas do meio em um determinado momento (BRECHELT, 2004). Considerando a diversidade genética e bioquímica que esses animais possuem e por vencerem as adversidades, é que esses animais se tornam tão interessantes para os ramos da toxinologia, toxicologia, farmacologia, biologia celular e molecular, entre outras áreas da ciência (VILCINSKAS; WEDDE, 2002).

Os artrópodes são a base da cadeia alimentar de muitos roedores, pequenos mamíferos, anfíbios e répteis, portanto, o controle populacional desses invertebrados ocorre naturalmente no ambiente selvagem (RUPPERT *et al.*, 2005). O desequilíbrio populacional dos artrópodes causa impactos ambientais desastrosos, além de desvantagens às atividades humanas. A presença de pragas rurais acarreta prejuízos econômicos não só aos ruralistas, como também aos consumidores (BRECHELT, 2004). Outro problema são os prejuízos domésticos causados por esses animais, como: danos em edificações, onde os principais envolvidos são os cupins, as traças e as formigas. Além disso, os artrópodes podem transmitir doenças aos animais domésticos e ao homem (ZORZENON, 2002). Em especial os artrópodes venenosos podem se tornar um problema de saúde pública, uma vez que causam alergias e ferimentos, podem incapacitar a vítima temporariamente para o trabalho, e podem, em alguns casos, levar as vítimas à morte. As aranhas são as principais responsáveis pela mortalidade nos casos envolvendo acidentes de artrópodes venenosos (MARTINS *et al.*, 2011).

Em geral, os artrópodes venenosos possuem alta sinantropia, a qual está associada à abundância de alimento, à ausência dos predadores naturais, à diminuição do território natural (selvagem) e ao acúmulo de lixo e sujeira. Além

disso, os artrópodes venenosos possuem a capacidade de esconder-se em edificações e permanecer em locais escuros e úmidos (RUPPERT *et al.*, 2005).

Dentre as classes de artrópodes venenosos, encontram-se os Aracnídeos, como escorpiões, lacraias e aranhas (RUPPERT *et al.*, 2005). As aranhas venenosas estão alocadas em três gêneros distintos: *Lactrodectus*, *Phoneutria* e *Loxosceles* (MARTINS *et al.*, 2011). Em Curitiba e região metropolitana, as aranhas do gênero *Loxosceles*, tornaram-se um problema de saúde pública devido ao elevado número de casos de envenenamento (DA SILVA *et al.*, 2004).

As aranhas do gênero *Loxosceles* são conhecidas como aranha-marrons, pois possuem uma coloração que varia de marrom claro a marrom escuro. Também são chamadas de aranhas violino, por possuírem um desenho que lembra tal instrumento musical no cefalotórax (FUTRELL, 1992; VETTER; VISSCHER, 1998). Outra característica do gênero é possuir três pares de olhos dispostos em semicírculo no cefalotórax (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005).

Há registro de quatro espécies de aranhas-marrons no estado do Paraná: *Loxosceles laeta*, *Loxosceles gaucho*, *Loxosceles hirsuta* e *Loxosceles intermedia*, sendo a última mais abundante em Curitiba e região metropolitana (FISCHER; VASCONCELLOS-NETO, 2005; MARQUES-DA-SILVA *et al.*, 2005; CHRISTOFF *et al.*, 2008).

O envenenamento de seres humanos com as toxinas de *Loxosceles* apresenta um conjunto de sinais e sintomas denominado Loxoscelismo, o qual inclui lesões cutâneas/dermonecróticas e/ou sintomas sistêmicos (APPEL *et al.*, 2008).

Os sintomas são causados principalmente pelo efeito das toxinas fosfolipases-D, que são as proteínas mais bem caracterizadas do veneno da aranha-marrom. Isoladamente essa toxina é capaz de reproduzir os eventos de dermonecrose, hemólise, agregação plaquetária, injúrias renais, aumento da permeabilidade vascular e resposta inflamatória intensa, observados no envenenamento (CHAVES-MOREIRA *et al.*, 2011).

A gravidade dos acidentes provocados por espécies venenosas depende de vários fatores do animal e da vítima. As variantes são: o sexo e o estado nutricional que o animal se encontra que irão influenciar na quantidade de veneno injetado. Os aspectos que envolvem a vítima são dependentes da idade, se criança ou adulto, do local onde ocorreu a picada, e se essa apresenta outras doenças que a fragilizem (ACIDENTES por animais peçonhentos, 2009).

O estudo sobre hemolinfa de diferentes animais tem avançado muito nos últimos anos. O crescente interesse está em conhecer as proteínas que a compõem e suas respectivas atividades. O conhecimento gerado pode levar ao desenvolvimento de produtos biotecnológicos que auxiliam na medicina ou servem como bioferramentas importantes para a ciência. Como exemplo, existem diversos grupos de inibidores de proteases comumente encontrados na hemolinfa dos artrópodes, alguns já demonstraram inibição frente à família das metaloprotease que é uma proteína presente em veneno de diversos animais (VILCINSKAS; WEDDE, 2002). Vários estudos também identificaram peptídeos antimicrobianos em hemolinfa (BOMAN, 1998 ; SILVA JUNIOR, 2000; CERAUL *et al.*, 2003; FOGAÇA *et al.*, 2006; BAUMANN *et al.*, 2010; MAFRA *et al.*, 2012).

Por definição, a hemolinfa é o líquido que banha a hemocele dos invertebrados. É um líquido frequentemente incolor ou levemente pigmentado que pode se apresentar em diferentes cores (amarelo, verde e azul) (GULLAN; CRANSTON, 2008). Todas as trocas químicas entre o tecido dos artrópodes é mediada pela hemolinfa, que é composta de células (hemócitos), altas concentrações de aminoácidos e fosfatos orgânicos, e concentrações variadas de açúcares, vitaminas, ácidos orgânicos (ácidos graxos), diacilglicerol, triacilglicerol, hormônios, íons inorgânicos e outros compostos importantes para processos homeostáticos. Ocasionalmente a hemolinfa transporta gases, pois como os artrópodes possuem um sistema de trocas gasosas traqueal, essa apenas auxilia no processo. Além disso, a hemolinfa também é uma importante reserva de água para esses animais (CUNNINGHAM *et al.*, 1994; RUPPERT *et al.*, 2005; GULLAN; CRANSTON, 2008; ZACHARIAH; MITCHELL, 2009).

Souza e colaboradores (2005) encontraram na hemolinfa de lagartas da espécie *Lononia obliqua* uma proteína protetora para células em cultura de Sf9. Os resultados mostraram que as células Sf9 quando tratadas com a hemolinfa de *L.obliqua* sofrem baixas taxas de apoptose em relação ao controle não tratado. Sugerindo assim, uma ferramenta que facilita o trabalho em cultura com tais células.

A espécie de aranha-marrom, *Loxosceles intermedia*, é considerada um problema de saúde pública, pois está envolvida com o crescente número de casos de envenenamento decorrentes de aranhas, principalmente no Paraná, aliando esse fato com a ausência de estudos da hemolinfa de *L. intermedia*, faz-se necessário conhecer melhor essa amostra uma vez que vários estudos com hemolinfa de outros artrópodes vêm demonstrado aplicações biotecnológicas interessantes principalmente para proteínas oriundas dessa complexa mistura que compõe a hemolinfa.

O conhecimento das características proteicas, lipídicas e das funções da hemolinfa no organismo do animal são relevantes não somente para toxinologia mas para ciência de forma geral. Além disso, essas moléculas podem ser passíveis de aplicações biotecnológicas. O presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização bioquímica das proteínas e dos lipídios presentes na hemolinfa da aranha-marrom *L. intermedia*, bem como identificar os hemócitos presentes na hemolinfa dessa espécie.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ARTRÓPODES

No filo Arthropoda estão incluídos, aranhas, escorpiões, insetos, centopéias, lacraias, caranguejos e camarões. A maioria dos animais conhecidos e descritos no mundo pertence ao filo dos artrópodes, o qual abriga cerca de um milhão de espécies encontradas em todos os ambientes: aquático, terrestre e aéreo (RUPPERT *et al.*, 2005). Sendo assim, esses animais constituem a maior representação de fauna do mundo, com grande sucesso evolutivo na diversidade de espécies e na colonização de habitats. Este filo tornou-se uma fonte poderosa de material para biologia celular, molecular e bioquímica; e muito conhecimento científico tem sido gerado a partir de estudos nessas áreas (VILCINSKAS; WEDDE, 2002; ZACHARIAH *et al.*, 2007).

As principais características dos artrópodes são: possuir exoesqueleto quitinoso, apresentar processo de ecdise, ter apêndices articulados e ausência de cílios locomotores (RUPPERT *et al.*, 2005; GULLAN; CRANSTON 2008). A morfologia externa varia dependendo da classe do artrópode, os aracnídeos possuem cefalotórax (fusão da cabeça e tórax) e abdômen, quatro pares de pernas e não possuem antenas, enquanto os insetos possuem cabeça, tórax e abdômen separados, um par de antenas e três pares de pernas (RUPPERT *et al.*, 2005; GULLAN; CRANSTON 2008).

O sistema de transporte interno de nutrientes e gases dos artrópodes é realizado por um sistema hemal constituído de coração, artérias, seios, hemolinfa e hemocèle (Figura 1). Os tecidos são banhados pela hemolinfa que funciona como um sistema de transporte de nutrientes, resíduos, hormônios e, às vezes, gases. Na ausência de celoma, a hemocèle é a cavidade funcional dos artrópodes (RUPPERT *et al.*, 2005).

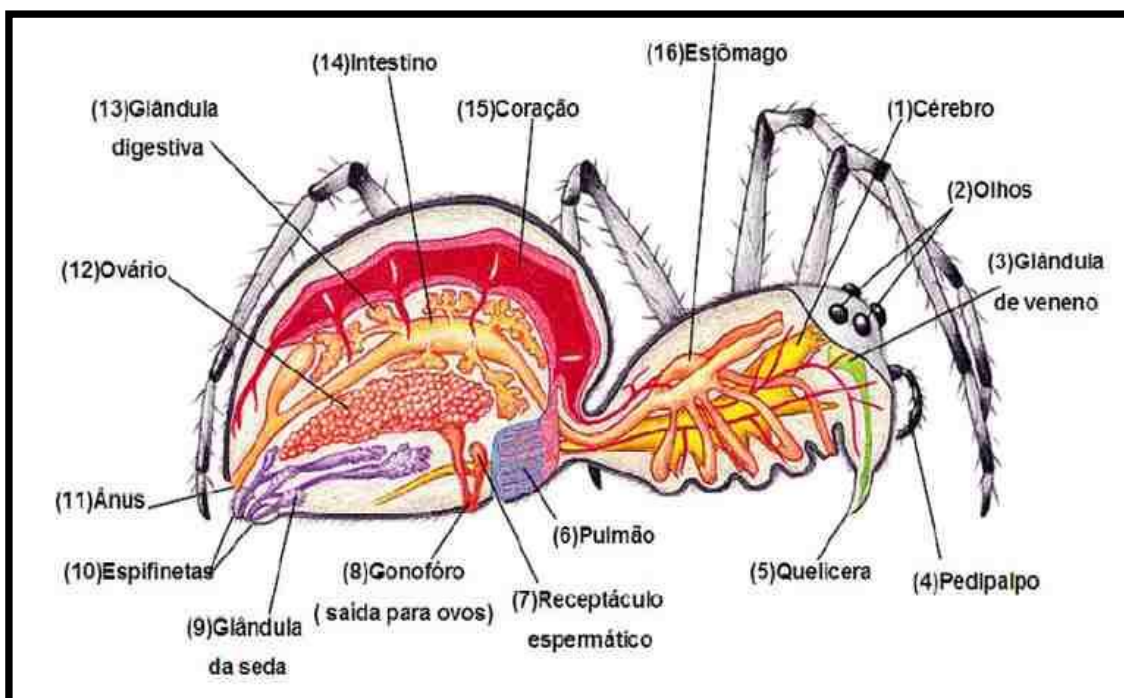


Figura 1- Desenho esquemático do sistema de transporte interno de aranha (Artrópode da classe Arachnida). Fonte: <http://araneae.hdfree.com.br/anatomiainterna.html>.

2.1.1 ARTRÓPODES VENENOSOS

Por definição são considerados artrópodes venenosos aqueles que possuem glândula produtora de veneno ligada ao aparelho inoculador, sendo capazes de injetar toxinas e/ou saliva proteolítica nas presas. Contudo, nas lagartas do gênero *Lonomia* o veneno está localizado nas cerdas, sendo uma exceção dentre os artrópodes venenosos. Após a inoculação/liberação do veneno, a presa é primeiramente liquefeita pela ação de enzimas e, em seguida, o material da presa é sugado através do aparelho bucal do animal predador (RUPPERT *et al.*, 2005; GULLAN; CRANSTON 2008; PALUDO, 2008).

Os artrópodes predadores matam e consomem várias presas durante seu ciclo de vida. Entre as estratégias de caça dos insetos e aracnídeos, são observadas três importantes: ficar e esperar, fazer armadilhas, e busca ativa; sendo que cada uma destas requer um investimento de tempo e gasto de energia distinto (GULLAN; CRANSTON, 2008). O veneno é uma vantagem aos

animais que o possuem, pois aumentam as chances de sucesso na caça, garantindo que seu investimento energético seja recompensado eficientemente. Além disso, o veneno muitas vezes é utilizado como forma de defesa, repelindo ou paralisando seu predador (RUPPERT *et al.*, 2005).

O veneno dos artrópodes é uma mistura complexa de proteínas de baixa massa molecular com ou sem atividade catalítica (hemolítica, proteolítica, colinesterásica, fosfolipásica) e geralmente são encontradas pequenas quantidades de aminoácidos (CUPO *et al.*, 2003; GREMSKI *et al.*, 2010).

Dentre os artrópodes venenosos podemos destacar a classe Arachnidae, onde estão incluídos os ácaros, carrapatos, opliões, escorpiões e aranhas. Os indivíduos dessa classe possuem como principais características oito pernas articuladas, não possuem asas e são desprovidos de antenas (RUPPERT *et al.*, 2005). São essas características que os diferenciam dos artrópodes da classe Insecta (classe dos insetos).

A classe Arachnida é composta por 14 ordens, dentre essas a ordem Araneae (aranhas) é uma ordem ímpar, pois seus representantes são os únicos que constroem teias (RUPPERT *et al.*, 2005).

Em muitas regiões do Brasil, os artrópodes venenosos se tornaram pragas urbanas e problemas de saúde pública, necessitando investimentos governamentais financeiros e científicos. Curitiba e região metropolitana, no Paraná, são consideradas áreas endêmicas para acidentes com a aranha-marrom da espécie *Loxosceles intermedia* (DA SILVA *et al.*, 2004).

A denominação hemolinfa é dada para o líquido que banha a hemocela de todos os invertebrados. A hemolinfa é um líquido incolor ou levemente pigmentado. Nos artrópodes pode variar entre amarelo, verde e azul, dependendo da espécie (GULLAN; CRANSTON, 2008; JALAL *et al.*, 2010). Como o sistema de circulação dos artrópodes é aberto, a hemolinfa é capaz de entrar em contato com todos os tecidos do animal. Desta forma, a hemolinfa é responsável por intermediar as trocas químicas e, eventualmente, gasosas (GULLAN; CRANSTON, 2008).

Além disso, na hemolinfa de vários artrópodes já foram descritos inibidores de algumas classes de toxinas que coincidentemente estão

presentes no veneno dos artrópodes (VILCINSKAS; WEDDE, 2002); o que torna o estudo desta amostra biológica ainda mais pertinente.

2.2 HEMOLINFA

A circulação da hemolinfa ocorre nos vasos do sistema hemal e por sistemas de bombas musculares que a movimentam por compartimentos separados por septos fibromusculares ou membranas (GULLAN; CRANSTON, 2008).

A quantidade e composição da hemolinfa variam conforme a espécie, o momento fisiológico e a fase do ciclo de vida do animal. Em aranhas a hemolinfa corresponde à cerca de 20% do seu volume corpóreo (ARAÚJO *et al.*, 2008; TRABALON *et al.*, 2010).

A hemolinfa é composta por células (hemócitos) e outros componentes essenciais para os processos homeostáticos como vitaminas, ácidos orgânicos (ácidos graxos), diacilglicerol, triacilglicerol, hormônios e íons, além disso, é uma importante reserva de água (GULLAN; CRANSTON, 2008; ZACHARIAH e MITCHELL, 2009; JALAL *et al.*, 2010). A hemolinfa pode eventualmente transportar gases associados aos pigmentos, mas nos aracnídeos existe um sistema de trocas gasosas traqueal, no qual as trocas ocorrem diretamente com o tecido (CUNNINGHAM *et al.*, 1994; RUPPERT *et al.*, 2005; GULLAN; CRANSTON, 2008).

A função da hemolinfa é mediar as trocas químicas entre os tecidos mantendo assim a homeostase do animal. Além disso, a hemolinfa participa da defesa imune inata dos artrópodes, em três eventos distintos: (a) promove a coagulação e vedação de eventuais ferimentos, evitando a perda desse fluido e a entrada de bactérias; (b) combate de micro-organismos invasores, parasitas ou outras substâncias estranhas, de forma diferente da resposta imunológica dos vertebrados, mas muito eficiente; (c) combate à predação, isso porque, na hemolinfa de alguns artrópodes pode conter substâncias malcheirosas ou repugnantes a predadores (GULLAN; CRANSTON, 2008; JALAL *et al.*, 2010).

Além da participação em diferentes processos fisiológicos, é sabido que a hemolinfa de alguns artrópodes pode apresentar função tóxica quando em contato com outros organismos. Akhunov e colaboradores (2001) constataram que a hemolinfa de aranhas da espécie *Latrodectus tredecimguttatus* é tóxica para mamíferos, levando a morte de camundongos após a administração de apenas 10 µg de proteínas totais da hemolinfa. Outro estudo mostrou que a hemolinfa de *Lonomia achelous* apresenta uma inesperada atividade fibrinolítica (AROCHA-PIÑANGO *et al.*, 2000).

Os estudos sobre hemolinfa acrescentam informações importantes sobre a biologia e fisiologia do animal. Nas aranhas da espécie *Brachypelma albopilosa* há uma variação na composição lipídica circulante na hemolinfa que ocorre entre as fases do ciclo de vida e nas épocas de acasalamento. Os cientistas afirmam que essa variação influencia o comportamento de predação, podendo inibi-lo ou estimulá-lo (TRABALON, 2011).

Não existem muitos dados na literatura sobre a hemolinfa de artrópodes, e as informações sobre hemolinfa de aranhas são ainda mais escassas. Especificamente, a hemolinfa de *L. intermedia* nunca foi estudada, não existindo trabalhos que abordem os elementos que a compõem.

2.3 PROTEÍNAS PRESENTES NA HEMOLINFA DOS ARTRÓPODES

As proteínas são moléculas essenciais a qualquer organismo vivo. São grandes fontes de energia e são fundamentais como matéria prima para composição e funcionamento celular, pois executam a maior parte das funções celulares (ALBERTS *et al.*, 2010).

Na hemolinfa dos artrópodes ocorrem proteínas livres no plasma, e proteínas associadas a lipídios, chamadas de lipoproteínas. (CAPPELARI *et al.*, 2009). A composição proteica e lipídica da hemolinfa de um artrópode pode variar de acordo com a sua espécie, idade e dieta nutricional (CHAPMAN, 1982; CAPPELARI *et al.*, 2009).

A composição proteica da hemolinfa inclui diferentes proteínas que atuam em funções fisiológicas distintas: hexamerinas (armazenagem de nutrientes),

lipoforinas ou lipoproteínas (transporte de lipídios), hemocianinas (transporte de oxigênio), ferritinas (presente em complexos contendo ferro) e hormônios de modo geral (CHAN *et al.*, 2006; GULLAN; CRANSTON, 2008; TRABALON *et al.*, 2010).

Uma proteína encontrada apenas na hemolinfa dos artrópodes é a hemelipoglicoproteína, que foi descrita na hemolinfa de carrapatos da espécie *Dermacentor marginatus*. É uma proteína de alta massa molecular que tem a função de se ligar a heme-proteína (oriunda da alimentação hematófaga) a hemelipoglicoproteína diminuindo a toxicidade da heme-proteína para o artrópode, além de estocá-la como forma de nutriente (DUPEJOVA *et al.*, 2011).

O ferro é um elemento essencial para alguns organismos, pois participa, por exemplo, do sítio catalítico de muitas proteínas, porém a sua forma livre do ferro é potencialmente perigoso por produzir espécies reativas de oxigênio. Então, alguns artrópodes possuem a transferrina, uma proteína de aproximadamente 80 kDa, que possuem alta afinidade pelo ferro, sendo responsável pelo transporte desse metal na hemolinfa (DUNKOV; GEORGIEVA, 2006).

Outras proteínas têm sido identificadas na hemolinfa dos invertebrados. Maranga e colaboradores (2003) realizaram a suplementação de células Sf-9 (células de *Spodoptera frugiperda*) com hemolinfa de *Lonomia obliqua*. O resultado foi que a hemolinfa de *L. obliqua* promoveu a longevidade e o crescimento das células Sf-9. Em seguida Souza e colaboradores (2005) identificaram elementos anti-apoptóticos na hemolinfa de *L. obliqua* e purificaram a fração proteica responsável por este efeito através de cromatografia de gel filtração.

As diferenças nas concentrações de proteínas totais na hemolinfa dos artrópodes foram relatadas no estudo de Zachariah e colaboradores (2007). Diferenças de espécie, de idade, de época de acasalamento, ou ainda, hidratação dos animais utilizados no estudo foram relatados como responsáveis pelas diferentes concentrações de proteínas. Entretanto, quando Trabalon e colaboradores (2010) analisaram a hemolinfa de aranhas

Brachypelma albopilosa, mesmo sexo, mas de idade distintas (jovens e adultos) não foram observadas diferenças significativas na concentração de proteínas totais. Há diferenças também na quantidade total de proteínas na hemolinfa nos diversos níveis hierárquicos de insetos sociais. Nas abelhas, a hemolinfa de larvas e adultos de abelhas trabalhadoras contém quantidade de hexamerinas maior do que a observada na abelha rainha. Por outro lado, a vitelogenina, que é uma proteína de armazenamento de lipídios, de proteínas e transporte de nutrientes em fêmeas, é abundante na rainha e insignificante no zangão (CHAN *et al.*, 2006).

A composição de aminoácidos livres em hemolinfa de aranhas é pouco estudada. Entretanto, é descrito que a glutamina é o aminoácido mais abundante, sendo outros aminoácidos, como a glicina, taurina, prolina, histidina e alanina bastante comuns (TILLINGHAST; TOWNLEY, 2008).

2.3.1 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DAS PROTEÍNAS DOS ARTRÓPODES

Na hemolinfa dos artrópodes foram encontradas, isoladas e caracterizadas proteínas com diferentes atividades biológicas e aplicações biotecnológicas. Há vários exemplos de inibidores de proteases oriundos de hemolinfa, o trabalho de Ashida e Sasaki (1994) descreve dois inibidores de proteases do tipo serpina na hemolinfa do bicho da seda (espécie *Bombyx mori*), um deles com ação em tripsina e outro em quimotripsina. Outro exemplo está no trabalho de Vilcinskis e Wedde (2002) onde são descritas proteínas inibidoras de metaloproteases provenientes da hemolinfa de *Drosophila melanogaster* e *Galleria mellonella*. Esses inibidores são semelhantes aos inibidores de metaloproteases dos vertebrados.

As proteínas que apresentam ações inibitórias muitas vezes participam das cascatas de regulação da resposta imune inata. Podem também atuar na proteção do animal contra ataques de predadores, e/ou nos processos de metamorfose e desenvolvimento do animal (POLANOWSKI; WILUSZ, 1996; RAI *et al.*, 2010).

Uma aplicação biotecnológica interessante descrita por Kim e colaboradores (2003) é de uma proteína recombinante da hemolinfa do bicho da seda (*Bombyx mori*). A proteína recombinante de 30 kDa inibiu a apoptose de células Sf9 e, os autores sugerem a utilização dessa proteína como um agente protetor de apoptose, prolongando as culturas comerciais na indústria. Semelhante a esse trabalho é o estudo de Maranga e colaboradores (2003) que observaram que a hemolinfa de *L. obliqua* também apresenta essa propriedade.

Segundo Rai e colaboradores (2010) os inibidores de proteases encontrados na hemolinfa dos artrópodes podem ser divididos em três classes: os inibidores do tipo “Kunitz” (abaixo de 10 kDa); os inibidores do tipo serpina (aproximadamente 45 kDa) e uma nova família de inibidores de serino-protease (4 kDa). Além disso, há outros inibidores descritos na hemolinfa que não se encaixam em nenhuma das classificações sugeridas (RAI *et al.*, 2010).

Uma vertente muito bem explorada da hemolinfa dos artrópodes são as moléculas com ação antimicrobiana. Essas moléculas servem como peptídeos de proteção para o animal frente a uma infecção bacteriana. Esses peptídeos antimicrobianos (AMPs) atuam na membrana celular das bactérias, provocando poros e consequente a morte do invasor. São liberados na hemolinfa a partir da percepção de partículas lipopolissacádicas comuns em bactérias, detectadas por hemócitos (JIRAVANICHPAISAL *et al.*, 2006). Os peptídeos antimicrobianos mais investigados são oriundos de outros artrópodes que não das aranhas, ilustrando a importância de se investir em pesquisas científicas com hemolinfa de aranhas (FUKUZAWA *et al.* 2008). Para ilustrar o exposto, o trabalho de Fogaça e colaboradores (2006) descrevem o isolamento e caracterização de um peptídeo com ação antimicrobiana procedente de hemócitos de carrapatos da espécie *Boophilus microplus*. O peptídeo apresentou ação contra *Micrococcus luteus* e *Escherichia coli*. Interessantemente, os autores também descreveram que o peptídeo possui ação inibitória frente a duas serino-proteases, elastase e quimotripsina.

Esses AMPs podem desempenhar as mais diversas atividades biológicas nos artrópodes, não possuem somente atividades antimicrobianas. Podem

atuar também como neurotransmissores, toxinas e hormônios. Além disso, os AMPs são moléculas que tem um amplo espectro de interação com fosfolípidios de membranas plasmáticas, com organelas membranosas e proteínas citosólicas, mediando as mais diversas vias de sinalização (SAIDEMBERG *et al.*, 2011).

A espécie de aranha *Acanthoscurria gomesiana* possui dois peptídeos antimicrobianos, denominados gomesina e acanthoscurrina, com ação comprovada no combate a *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Cryptococcus neoformas*, *Saccharomyces cerevisiae* e fungos filamentosos. Outros dois peptídeos, denominados mygalomorphina e theraphosinina, foram descritos, mas ainda não foram testados (SILVA JUNIOR, 2000; FUKUZAWA, 2007). Yiğit e Benli (2008) estudaram a hemolinfa de uma aranha venenosa da espécie *Agelena labyrinthica* (Araneae: Agelenidae) originária da Turquia, esses autores afirmam que há AMPs na hemolinfa dessa aranha que são efetivos no combate de *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sp.*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Gomesin foi o primeiro peptídeo antimicrobiano isolado de células da hemolinfa de aranhas da espécie *Agelena labyrinthica* (YİĞİT e BENLİ, 2008).

Greco e colaboradores (2009) avaliaram a atividade antiviral da hemolinfa de *Lonomia obliqua*. Os autores perceberam que havia vários trabalhos pesquisando a existência e funcionalidade de antivirais na hemolinfa de diversos insetos não venenosos. Por exemplo, na lagarta do tabaco (*Heliothis virescens*) foi encontrada uma molécula com atividade antiviral sobre vírus de vertebrados, como o vírus do Herpes tipo 1 e 2 (OURTH; RENIS, 1993). Portanto, a atividade antiviral da hemolinfa da *L. obliqua* foi estudada analisando a viabilidade celular de células VERO e MDCK infectadas com vírus da influenza (H1N1), Polio (Sabin 1) e Sarampo (Edmonston). Observou-se que os grupos tratados com hemolinfa apresentaram maior taxa de viabilidade celular do que os grupos controle, ou seja, as células tratadas são menos infectadas do que as não tratadas. Os autores sugerem então que a proteína presente na hemolinfa responsável por esse efeito é uma proteína que se liga ao receptor celular pelo qual o vírus realiza os primeiros contatos, sem esse

contato inicial com a célula o vírus não é internalizado, sendo assim tem seu poder de infecção diminuído (GRECO *et al.*, 2009).

Devido às diversas atividades biológicas e aplicações biotecnológicas encontradas nos componentes da hemolinfa dos artrópodes fica notória a importância de investigá-los cientificamente. A hemolinfa dos artrópodes venenosos é ainda mais intrigante por ter sido menos explorada até o presente momento.

2.3.2 HEMOCIANINA

As proteínas mais abundantes na hemolinfa dos artrópodes são as hemocianinas, proteínas que possuem em seu sítio ativo o íon cobre que as permitem transportar moléculas de gás oxigênio. A hemocianina ocorre como grandes moléculas extracelulares (JIRAVANICHPAISAL *et al.*, 2006).

Em artrópodes cerca de 80-86% das proteínas totais da hemolinfa são hemocianinas (RUPPERT *et al.*, 2005). Estudos de hemolinfa de duas espécies de aranhas migalomorfas (*Eurypelma californicum* e *E. helluo*) mostraram que as hemocianinas representam 80% das proteínas totais, já para duas espécies de aranhas araneomorfas (*Nephila inaurata* e *Cupiennus salei*) elas podem variar entre 70-95% das proteínas que compõem a hemolinfa (TRABALON *et al.*, 2010).

A hemocianina de artrópodes possui subunidades proteicas com massa molecular de 70-75 kDa por cadeia polipeptídica, as quais são organizadas em hexâmeros, podendo estar estruturadas em hexâmeros simples (1 x 6mers) ou múltiplos (2x6mers, 4x6mers, 6x6mers e 8x6mers) (Figura 2) (CERENIUS; SODERHALL, 2004; DECKER *et al.*, 2007; JALAL *et al.*, 2010).

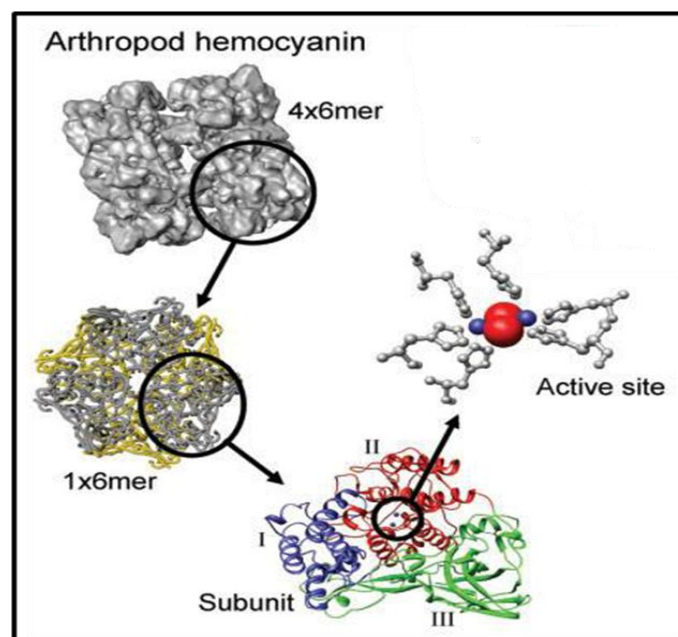


Figura 2- Estrutura tridimensional de hemocianina de artrópodes. Note apenas um sítio ativo e uma unidade funcional. Adaptado de Decker *et al.*, 2007.

Já foram identificadas cadeias de hemocianinas com maior massa molecular (110-140 kDa e 200-210 kDa) e com menor (30-60 kDa e 35-65 kDa). Os autores sugerem que essa identificação de cadeias de hemocianinas com massas moleculares menores ou maiores do que 70-75 kDa possa refletir modificações pós-traducionais, modificações químicas e/ou proteólise. Outra hipótese, é que possam ser dímeros (110-140 kDa) e trímeros (200-210 kDa), os quais não foram desfeitos por falha nas reações de redução antecedentes à corrida eletroforética (TRABALON *et al.*, 2010). Trabalon e colaboradores (2011) estudaram por espectrometria de massas a hemolinfa da aranha *Brachypelma albopilosa* e descrevem a hemocianina com sete subunidades diferentes e possíveis modificações pós-traducionais. Além disso, afirmam que as cadeias de hemocianina permanecem unidas mesmo após tratamentos com agentes redutores e detergentes como o dodecil sulfato de sódio (SDS) (TRABALON *et al.*, 2010). Nesse mesmo trabalho, após a separação proteica da hemolinfa de aranhas *Brachypelma albopilosa*, realizada em SDS-PAGE unidimensional, foram identificadas 22 bandas. O sequenciamento dessas proteínas revelou sete subunidades distintas de hemocianina (cadeias a, b, c, d, e, f e g) e actina (TRABALON *et al.*, 2010). A grande quantidade de

hemocianina identificada nessa espécie de aranha é comum para os demais artrópodes, corroborando com a observação de que a hemocianina é o componente proteico mais abundante em hemolinfas (TRABALON *et al.*, 2010; DECKER *et al.*, 2007, RUPPERT *et al.*, 2005). Já a identificação de actina como componente de hemolinfa foi descrita somente em *Drosophila melanogaster*. Sugere-se que a actina possa ser um contaminante, devido à lise de células durante a coleta do material, mas não se pode excluir uma possível secreção fisiológica dessa molécula. As funções fisiológicas de actina circulante ainda não são caracterizadas, mas acredita-se que poderia estar envolvida na resposta imune e/ou nos eventos de coagulação interagindo com componentes da cascata de coagulação (TRABALON *et al.*, 2010).

Diferentes trabalhos que estudam as hemocianinas de artrópodes apontam para participação dessa proteína em diferentes eventos fisiológicos na hemolinfa dos artrópodes. Cunningham e Pollero (1996) ao analisar o plasma da aranha *Polybetes pythagoricus* afirmaram que a hemocianina é um pigmento respiratório, e que também está envolvida no transporte de lipídios. Esses autores identificaram hemocianina em complexos de HDL (*High-Density Lipoprotein* - lipoproteína de alta densidade) e de LDL (*Low-Density Lipoprotein*- lipoproteína de baixa densidade). Portanto, esse pigmento respiratório pode carregar uma quantidade significativa de lipídios no plasma da hemolinfa dessa aranha. Outros trabalhos mostram que a hemocianina do plasma de artrópodes quelicerados (aranhas e escorpiões) pode exibir atividade de fenoloxidase e catalisar a síntese de melanina. Isso porque, em quelicerados, falta uma fenoloxidase específica que catalisa a oxidação de fenóis a quinonas, constituindo o primeiro passo para a produção da melanina, que é importante para os artrópodes, pois exerce participação no processo de melanização na defesa inata (DECKER *et al.*, 2007; CERENIUS; SODERHALL, 2004; FUKUZAWA, 2007). Um estudo recente mostrou que a hemocianina também pode ser utilizada como um componente estrutural na construção da cutícula, especialmente na tarântula *Eurypelma californicum* (TRABALON *et al.*, 2010). Estudos de composição bioquímica com a hemolinfa de escorpiões relatam que a hemocianina é funcionalmente semelhante às hemoglobinas e é

uma das proteínas mais complexas e sofisticadas dos artrópodes (MOUSLI *et al.*, 1998).

Outros componentes importantes e ainda pouco investigados na hemolinfa dos artrópodes venenosos são os lipídios e lipoproteínas. Os lipídios servem de reserva energética enquanto as lipoproteínas fazem o transporte desses lipídios na hemolinfa, suprimindo energeticamente todos os tecidos do animal (RUPPERT *et al.*, 2005).

2.4 COMPOSIÇÃO DE LIPOPROTEÍNAS E LIPÍDIOS NA HEMOLINFA DOS ARTRÓPODES

O corpo gorduroso dos artrópodes armazena e metaboliza lipídios de vital importância para a fisiologia desses animais (RUPPERT *et al.*, 2005). Os lipídios suprem necessidades metabólicas, tais como metamorfose, manutenção das membranas, energia para sistemas fisiológicos e reprodução. Em aracnídeos não existe uma estrutura análoga ao corpo gorduroso dos insetos (GULLAN; CRANSTON, 2008). Porém, baseando-se em evidências histológicas e ultraestruturais acredita-se que um local especializado do intestino seja o órgão responsável por armazenar e metabolizar lipídios nos aracnídeos (TRABALON, 2011). Há pouca informação e pouco se sabe sobre a química da hemolinfa dos aracnídeos do ponto de vista lipídico (LAINO *et al.*, 2009; TRABALON, 2011).

Em artrópodes, os lipídios não circulam livremente pela hemolinfa, devido ao seu caráter hidrofóbico associam-se essencialmente a proteínas hidrossolúveis denominadas “Lipophorin” (lipoproteínas) (CUNNINGHAM *et al.*, 2007). Os lipídios são carregados principalmente na forma de diacilglicerol. São tão relevantes que a maior parte dos lipídios em trânsito na hemolinfa está na forma de diacilglicerol associada a essa lipoproteína (ARRESE *et al.*, 2001; CUNNINGHAM *et al.*, 2007; LAINO *et al.*, 2009).

Cunningham e Pollero (1996) encontraram lipídios de diversas classes na hemolinfa das aranhas da espécie *Polybetes pythagoricus*. Os lipídios totais do plasma foram analisados por diferentes técnicas cromatográficas. As

lipoproteínas de alta densidade (HDL) perfaziam 23% do total de lipídios no plasma, enquanto as lipoproteínas de muito alta densidade (VHDL) teve representatividade 47% dos lipídios totais no plasma dessas aranhas. Nas duas frações, HDL e VHDL, os fosfolipídios representavam mais da metade dos lipídios totais analisados, com clara predominância da fosfatidilcolina.

Cunningham e colaboradores (2007) realizaram uma revisão de literatura comparando as características de lipoproteínas na hemolinfa de três espécies de aranhas: *Eurypelma californicum*, *Polybetes pythagoricus* e *Latrodectus mirabilis*. Resultando nas seguintes observações: *P. pythagoricus* e *L. mirabilis* contém HDL que varia em massa total e composição lipídica. Além disso, viram que *P. pythagoricus* e *E. californicum* possuem na hemolinfa uma lipoproteína VHDL. Concluíram que a composição das lipoproteínas e a composição lipídica podem variar de acordo com a espécie da aranha, mesmo que estejam incluídas na mesma classe.

Outro trabalho que aborda as lipoproteínas da hemolinfa de artrópodes é o de Schenk e colaboradores (2009), onde foi descrita a purificação e caracterização de uma lipoproteína da hemolinfa de escorpião *Pandinus imperator*. As lipoproteínas da hemolinfa foram separadas por gradiente de densidade seguido de ultracentrifugação (417.000xg, 3 horas, 4° C). A lipoproteína identificada é uma HDL. A massa molecular identificada foi de 500 kDa e o teor lipídico foi 70% de lipídios neutros e 30% de fosfolipídios (fosfatidilserina, fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina).

Trabalon e colaboradores (2011) estudaram por espectrometria de massas a hemolinfa da aranha *Brachypelma albopilosa* identificaram lipoproteínas dos tipos HDL e VHDL em quantidades diferentes em sub-adultos e adultos, supondo que a fase de ecdise pode alterar a composição da hemolinfa dessa espécie.

Hormônios também são carregados na hemolinfa na forma de lipoproteínas. Ritdachyeng e colaboradores (2012) clonaram e caracterizaram o hormônio juvenil e de ecdise em “broca do bambu”, *Omphisa fuscidentalis*. Enquanto Jaenicke e colaboradores (1999) relataram a interação da

hemocianina e hexamerinas com o hormônio ecdisona em aranhas da espécie *Eurypelma californicum*.

2.5 COMPOSIÇÃO CELULAR DA HEMOLINFA DOS ARTRÓPODES

As células presentes na hemolinfa são denominadas de hemócitos, os quais são nucleados e possuem quatro funções básicas: fagocitose, coagulação da hemolinfa, armazenamento e distribuição de nutrientes (GULLAN; CRANSTON, 2008). Há pelo menos três tipos comuns de hemócitos na maioria dos artrópodes: pró-hemócitos, plasmatócitos e os granulócitos (LAVINE; STRAND, 2002). Cada tipo de hemócito possui características peculiares baseadas na morfologia das células em microscopia de luz e mais recentemente em eletrônica.

Além dos hemócitos citados acima foram descritos outros tipos celulares nas mais diversas espécies de artrópodes. Por exemplo, os oenocitóides são células que possuem em seu citoplasma as proteínas pró-fenoloxidades, precursores de enzimas responsáveis pela melanização, processo de isolamento de organismos invasores (LAVINE; STRAND, 2002).

Os artrópodes apresentam ainda os nefrócitos, que são células localizadas na hemocele e atuam como glândulas sem ducto que filtram a hemolinfa, retirando certas substâncias e metabolizando-as para excreção. E os enócitos, que podem estar na hemocele, no corpo gorduroso (reserva lipídica) ou na epiderme, aparentemente apresentam função de síntese de lipídios (hidrocarbonetos), embora isto ainda não tenha sido totalmente esclarecido (GULLAN; CRANSTON, 2008).

Porém, há uma grande dificuldade em caracterizar os tipos celulares, pois a distinção é feita comparando a morfologia celular com as já descritas, mas há muitas variações de morfologia entre espécies de artrópodes, além disso, existem muitas sinonímias na denominação dessas células. Isto se deve ao fato de que os hemócitos de diferentes espécies foram sendo caracterizados ao longo dos anos em estudos isolados (GUPTA, 2009).

Os hemócitos são constantemente produzidos, embora sua taxa de produção possa ser alterada de acordo com as influências de diversos fatores ambientais (JIRAVANICHPAISAL *et al.*, 2006). As informações ainda são obscuras sobre a diferenciação dos hemócitos, a determinação dos tecidos hematopoiéticos nos artrópodes e o desenvolvimento do sistema embrionário que envolve tais células; pois cada ordem dentro dos artrópodes possui um tecido de origem diferente (CHAPMAN, 1982; GUPTA, 2009).

Dependendo da espécie do animal, alguns tipos de hemócitos se encontram indiferenciados na hemocele, outros são originados de células que se desprendem do coração, e alguns tem origem em órgãos linfóides e na glândula neural (FUKUZAWA, 2007). Lavine e Strand (2002), utilizando insetos, afirmam que os hemócitos desses animais são originados durante a embriogênese, provenientes da mesoderme do dorso ou da cabeça. Nos insetos, o pico da produção de hemócitos ocorre durante a fase larval e de ninfa, após esses períodos a produção de novos hemócitos se dá pela divisão de células hematopoiéticas da mesoderme ou dos hemócitos da circulação (LAVINE; STRAND, 2002).

Com a evolução das ferramentas analíticas os trabalhos com hemócitos se tornaram mais ricos e detalhados, e com diferentes aplicabilidades. Por exemplo, o artigo de Fukuzawa e colaboradores (2008) utiliza técnicas de imunofluorescência para observar a co-localização de dois peptídeos antimicrobianos em hemócitos de aranhas da espécie *Acanthoscurria gomesiana*.

O papel principal dos hemócitos nos artrópodes está ligado à defesa imune, estas células reconhecem os microorganismos invasores, realizam a fagocitose, citotoxicidade e promovem melanização, encapsulação e nodulação (LAVINE; STRAND, 2002). Nesses processos de defesa imune inata, o microorganismo invasor é isolado por proteínas de melanina de coagulação (melanização) ou por camadas de hemócitos que se fixam aos tecidos sendo encapsulados formando os nódulos (encapsulação e nodulação) (GILLESPIE; KANOST, 1997). Os peptídeos antimicrobianos (AMPs) são liberados pelos

hemócitos na hemolinfa dos artrópodes como uma das formas de defesa imune (JIRAVANICHPAISAL *et al.*, 2006).

Contudo nada se sabe sobre a composição celular da hemolinfa de *L.intermedia*, seus hemócitos ainda não foram caracterizados e a composição proteica e lipídica é completamente desconhecida.

2.6 ARANHAS DA ESPÉCIE *Loxosceles intermedia*

O gênero *Loxosceles* possui mais de 100 espécies que habitam amplamente as Américas e África que são seus centros de origem, além da Ásia, Oceânia, oeste da Índia, Europa Mediterrânea e China (DA SILVA *et al.*, 2004; MARQUES-DA-SILVA *et al.* 2005; CHAIM *et al.*, 2011a). A diversidade de habitats ocorre devido à capacidade de suportar grandes variações de temperatura (de 8 a 43°C) e de suportar longos períodos sem se alimentar e ingerir água (CHRISTOFF *et al.*, 2008). Atualmente, verifica-se a existência de 10 espécies de aranha-marrons no Brasil, sendo que quatro dessas são registradas no estado Paraná: *Loxosceles intermedia*, *Loxosceles laeta*, *Loxosceles gaucho* e *Loxosceles hirsuta* (FISCHER; VASCONCELLOS, 2005; MARQUES-DA-SILVA *et al.*, 2005; CHRISTOFF *et al.*, 2008).

As aranhas do gênero *Loxosceles* pertencem à família Sicariidae, subordem Araneomorphae, ordem Araneae, classe Arachnida, subfilo Chelicerata e filo Arthropoda (PLATNICK, 2008). São popularmente conhecidas como aranhas-marrons por apresentarem uma coloração característica que varia de marrom claro a marrom escuro, esta variação ocorre entre as diferentes aranhas do gênero *Loxosceles* e auxilia na distinção e identificação das espécies. Podem também ser identificadas por um desenho em forma de violino na superfície dorsal do cefalotórax (FUTRELL, 1992; MÁLAQUE *et al.*, 2002; VETTER; SWANSON, 2006; VETTER; ISBISTER, 2008). Outro método consistente de identificação das aranhas-marrons é o padrão dos olhos: elas exibem seis olhos arranjados aos pares sobre o cefalotórax, em uma disposição em semicírculo, característica deste gênero (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2004; APPEL *et al.*, 2005). Morfologicamente, apresentam

comprimento corporal variando de 8 a 15 mm e pernas medindo de 8 a 30 mm (DA SILVA *et al.*, 2004). Entretanto, é importante salientar que a identificação de *L. intermedia* se dá pela associação destas características (coloração, desenho de violino e posição dos olhos) e não pela observação de características isoladas (PALUDO, 2008). A figura 3 ilustra o dimorfismo sexual que essas aranhas apresentam, sendo normalmente as fêmeas maiores que os machos (GILBERT, 1997).

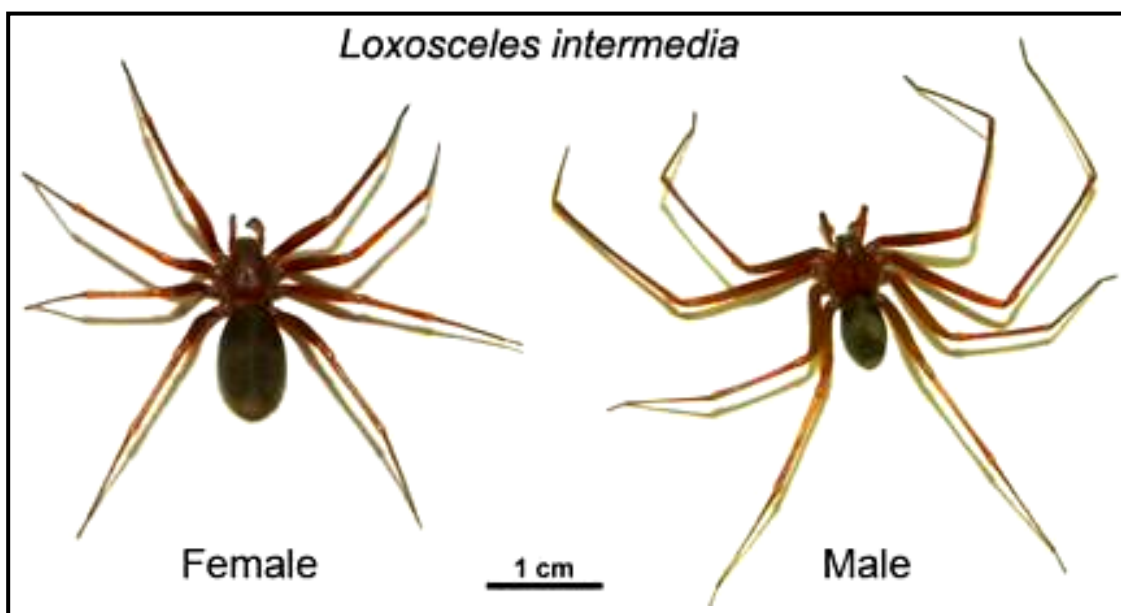


Figura 3- Dimorfismo sexual na espécie *Loxosceles intermedia*. Aranha fêmea (esquerda) e aranha macho (direita). Adaptado de: CHAIM, *et al.*, 2011a.

Segundo Andrade e colaboradores (1999), as aranhas-marrons possuem hábitos noturnos, e são sedentárias, alimentando-se principalmente de insetos pequenos. Seus habitats naturais são principalmente locais escuros e que promovem algum tipo de proteção a elas. No ambiente intradomiciliar, essas aranhas podem ser encontradas atrás de quadros, sob a mobília, em gavetas e entre as roupas (FUTRELL, 1992; FISCHER; VASCONCELLOS, 2005). Grande parte dos acidentes com *Loxosceles* ocorre devido à compressão inadvertida da aranha ao vestir-se, enxugar-se ou durante o sono, ocorrendo a picada no homem apenas como forma de defesa (FUTRELL, 1992).

O loxoscelismo é o quadro clínico que ocorre após o acidente com aranhas do gênero *Loxosceles*, inclui sintomas locais como lesões cutâneas ou também chamadas de dermonecroticas, caracterizadas por um ponto

avermelhado pouco dolorido (APPEL *et al.*, 2008). Após a picada, há o surgimento de uma área de tecido isquêmico, circundada por um halo vermelho e zonas pálidas, denominados placa marmórea após um período de 12 a 48 horas após a picada. Com o passar do tempo, a lesão torna-se violeta escura e um nítido espalhamento gravitacional aumentando. A agressão causada ao acidentado pode produzir ferimentos por longos períodos de tempo, com ulcerações cutâneas persistentes (FUTRELL, 1992).

Alguns casos de loxoscelismo desenvolvem sintomas sistêmicos, que são hemólise e distúrbios renais que podem se complicar e levar ao óbito (CHAIM *et al.*, 2006; APPEL *et al.*, 2008). Segundo Coutinho (1996), a insuficiência renal aguda (IRA) é decorrente da necrose tubular renal. Sugere-se que a hemoglobina livre, vindo das hemácias que sofreram hemólise, precipita-se ao longo dos néfrons e retarda o fluxo tubular renal, causando uma redução na filtração glomerular, deste modo levando a falência do órgão, e ocasionalmente, pode levar o acidentado a óbito (FUTRELL, 1992; DA SILVA *et al.*, 2004).

Os sintomas acima descritos são causados principalmente pelo efeito da toxina dermonecrótica, a toxina mais bem caracterizada do veneno da aranha-marrom. Esta toxina isolada é capaz de promover os eventos de dermonecrose, hemólise, agregação plaquetária, injúrias renais, aumento da permeabilidade vascular e resposta inflamatória intensa (CHAIM *et al.*, 2006; PALUDO, 2008).

Além da toxina dermonecrótica, denominada fosfolipase-D, o veneno ainda possui peptídeos com ação inseticida, nucleotídeos e proteínas de baixa massa molecular (5-40 kDa), outras toxinas encontradas no veneno são as hialuronidades, serino-proteases e metaloproteases do tipo astacinas (FUTRELL, 1992; FEITOSA *et al.*, 1998; VEIGA *et al.*, 2000a, 2000b; YOUNG; PINCUS, 2001; VEIGA *et al.*, 2001; DA SILVA *et al.*, 2004; BARBARO *et al.*, 2005; da SILVEIRA *et al.*, 2007; CHAIM *et al.*, 2011b).

É importante registrar que a espécie *L. intermedia* é a de maior distribuição no estado do Paraná e a principal espécie relacionada com

acidentes no município de Curitiba (MARQUES-DA-SILVA *et al.*, 2005), sendo essa uma das razões em ser o objeto de estudo desse trabalho.

Em dias atuais, onde cada vez mais a informação é a grande motivadora da ciência e geradora das novas ideias e novas perguntas, fica evidente a importância de se compreender os processos fisiológicos que regem a vida de um animal tão interessante, esse artrópode produtor de veneno, a aranha-marrom.

Em outras espécies de aranhas e/ou artrópodes a hemolinfa é alvo de pesquisas voltadas para moléculas com possíveis aplicações biotecnológicas, como peptídeos antimicrobianos, além de atividade antiviral e inibidora de proteases investigada. Outro aspecto que extremamente interessante é a presença de inibidores de proteases encontrados em hemolinfas de diversos artrópodes (VILCINSKAS; WEDDE, 2002). Vários trabalhos com aranhas de outras espécies já identificaram os peptídeos antimicrobianos com ações efetivas em bactérias gram-negativas e atualmente buscam expressar tais peptídeos em sistemas químicos artificiais e em sistemas orgânicos heterólogos (CUNNINGHAM *et al.*, 1999; KUHN-NENTWIG, 2003; DECKER *et al.*, 2007; FUKUZAWA *et al.*, 2008; BAUMANN *et al.*, 2010; ROSSI *et al.*, 2012).

Tendo em vista a grande variedade de moléculas bioativas já encontradas na hemolinfa dos artrópodes, e levando em consideração que a aranha-marrom é uma espécie venenosa, vê-se a necessidade de se estudar sua composição molecular e atividades biológicas já que essas não têm sido abordadas nas pesquisas e estudos da área de toxinologia de *Loxosceles*.

A hemolinfa é um material que apresenta grande diversidade bioquímica e sua compreensão trará conhecimento no que se refere à biologia da aranha. Além disso, a hemolinfa constitui uma fonte de novas moléculas, cujo estudo poderá indicar aplicações biotecnológicas, tanto no loxoscelismo quanto em outras áreas biomédicas.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Estudar as características bioquímicas e biológicas da hemolinfa de aranha-marrom (*Loxosceles intermedia*).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Estabelecer o protocolo de coleta de hemolinfa de *Loxosceles intermedia*;
- Caracterização do perfil proteico da hemolinfa de *L. intermedia* por meio de ensaios bioquímicos;
- Caracterização do perfil de glicosilação das proteínas totais da hemolinfa de *L. intermedia*;
- Caracterização do perfil lipídico da hemolinfa de *L. intermedia*;
- Caracterização do hemócitos presentes na hemolinfa de *L. intermedia*;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DA HEMOLINFA

A hemolinfa foi coletada de aranhas-marrons adultas (fêmeas e machos), obtidas da natureza e mantidas temporariamente no Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos (LME) da Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, Brasil (Autorização do SISBIO - anexo 1).

As aranhas foram anestesiadas com clorofórmio e imobilizadas com fita adesiva de forma que a região dorsal ficasse voltada para cima. A coleta da hemolinfa se deu com agulha (BD Micro-Fine TM+ Demi 8 mm, Diâmetro 0,30 mm) ambientada com PBS (137 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 10 mM Na₂HPO₄; 2 mM KH₂ PO₄), contendo 5% do de coquetel de inibidores de proteases - CIP (*Protease inhibitor cocktail for mammalian tissues*, Sigma). A agulha foi inserida na região final do cefalotórax, mais próxima do abdômen, e a hemolinfa foi extraída do vaso dorsal principal.

A hemolinfa coletada foi depositada em microtubos de 1.5 mL com 20 µL de PBS e 5% de CIP, em seguida armazenada em freezer -20°C, até o momento do uso ou foram utilizadas a fresco logo após a coleta.

A hemolinfa foi armazenada por um tempo máximo de um mês; para evitar a degradação proteica. Sendo assim, a coleta foi realizada a cada mês ou quando houve a necessidade de amostras, de acordo com a programação experimental.

4.2 OBTENÇÃO DA HEMOLINFA LIVRE DE CÉLULAS

Após a coleta, a hemolinfa foi centrifugada 800xg por 30 minutos a 4°C (FUKUZAWA, 2007) e o sobrenadante livre de células foi armazenado em um novo microtubo. A quantificação de proteínas totais do sobrenadante livre de células, foi realizada pelo método de dosagem de proteína azul brilhante de Coomassie (BioRad), método de Bradford (1976). A fração celular foi lisada

com 2/3 do volume celular de tampão de lise (50 mM Tris-HCl pH 7,3; 150 mM NaCl; 0,5% Triton X-100) mantido sob agitação por 30 minutos a 4°C, em seguida centrifugado 1000 rpm por 20 minutos. O precipitado celular foi descartado e o sobrenadante foi dosado por BCA (*Micro BCA Protein Assay Kit* – Thermo Scientific), descrito por Smith *et al.*, 1985.

4.3 ELETROFORESE DE PROTEÍNAS (SDS-PAGE)

Para analisar as proteínas presentes na hemolinfa, foi realizada eletroforese em gel gradiente desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE 5 a 15%) sob condições redutoras e não redutoras. O perfil proteico foi visualizado pela coloração de azul brilhante de Coomassie ou por impregnação de prata (WRAY *et al.*, 1981).

As eletroforeses foram realizadas utilizando mistura de solução de acrilamida (acrilamida 5 M e bis-acrilamida 52 mM), tampão “*lower*” (Tris 1,5 M; SDS 0,4% (p/v); pH 8,8), água destilada e os catalisadores APS e TEMED e em condições redutoras (5% de β -mercaptoetanol), como descrito por Laemmli (1970). Os géis foram confeccionados com gel de empacotamento (*Stacking* - contendo 4% de poliacrilamida e os catalisadores) na parte superior, proporcionando uma corrida mais homogênea.

4.4 GEL DE BIDIMENSIONAL (2D)

Para a realização das eletroforeses bidimensionais foi utilizado o sistema IPGphor Isoelectric Focusing System da GE Healthcare.

Para a corrida em gel 2D a hemolinfa de 30 aranhas (machos e fêmeas) foram coletadas diretamente em tampão de reidratação (uréia 7 M, tiouréia 2 M, CHAPS 2%, DTT 7 mg/mL, azul de bromofenol 0,002%, IPG Buffer 0,5% (na faixa de pH usada) e dosadas pelo 2-D Quant Kit da GE Healthcare. Muitos dos reagentes utilizados para a preparação das amostras incluem detergentes, agentes caotrópicos, redutores, entre outros, que são incompatíveis com os

métodos de dosagens de proteínas convencionais, como o Bradford. O ensaio com 2-D Quant Kit é baseado redução de íons de cobre (Cu^{2+} para Cu^+) quando em contato com as proteínas (Figura 4). Nesse método de dosagem as proteínas são precipitadas e ressuspensas em solução de cobre, e o cobre não ligado é mensurado por um agente colorimétrico. A densidade da cor é inversamente relacionada com a concentração de proteínas na amostra. O ensaio utiliza uma curva padrão de BSA gerando uma resposta linear em relação a concentração de proteínas. As absorvâncias são determinadas em 480 nm, necessitando do calculo da equação da reta. A capacidade máxima de mensuração do kit é de 50 μg de proteínas. Este procedimento é compatível com as amostras que possuem SDS a 2%, DTT a 1%, 8 M de uréia, 2 M de tiouréia, 4% de CHAPS e 2% IPG Buffer (WEIST *et al.*, 2008).

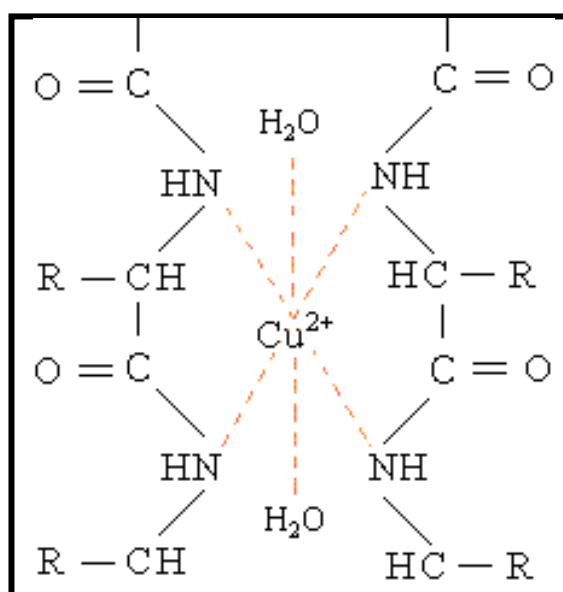


Figura 4- Interação entre o Cu^{2+} e as ligações peptídicas das proteínas. Fonte: <http://www.fcfar.unesp.br>

A focalização isoeétrica foi realizada com fitas de géis comerciais da GE (Immobiline™ DryStrip Gels) que possuem gradiente de pH imobilizado. Foram utilizadas as fitas de 13 cm com pH 3-10 e pH 4-7 lineares. A fita com pH 3-10 foi reidratada com tampão de reidratação contendo 100 μg de proteínas totais da hemolinfa de *L. intermedia* e a fita com pH 4-7 foi reidratada com tampão de

reidratação contendo 150 µg de proteínas totais da hemolinfa de *L. intermedia*. Após 16 horas de reidratação, a focalização isoeletrica foi iniciada nas seguintes condições: 50 mA/fita; no primeiro estágio utilizou-se 500 V durante 1h; no segundo estágio 1000 V durante 1 h; e no terceiro estágio 8000 V de 1h, e o ultimo estágio também de 8000 V também de 1 h. Ao término da focalização isoeletrica, as fitas foram congeladas a -80°C.

Para a segunda dimensão as fitas já focalizadas foram descongeladas e equilibradas com tampão de equilíbrio (uréia 6 M, Tris-HCl pH 8,8 75 mM; 29,3% glicerol, 2% SDS; 0,002% azul de bromofenol), contendo DTT 10 mg/mL em seguida foi adicionado 25 mg/mL de iodoacetamida. A corrida eletroforética se deu com corrente de 45 mA e 600V a 15°C. Durante a separação das proteínas não é vantajoso que essas estejam interagindo por meio de pontes dissulfeto, isso pode causar um acumulo de proteínas em um mesmo *spot*, e não permitirá que essas proteínas sejam de fato separadas. Por isso é utilizado o DTT e a iodoacetamida, o primeiro mantém o ambiente redutor na amostra, e o segundo promove a alquilação das cisteínas.

Em seguida, os géis foram fixados em solução fixadora (ácido orto-fosfórico 1,3%, metanol 20% em água destilada) por 1 hora, corados com 400 mL da solução A (metanol 20%, ácido orto-fosfórico 2%, sulfato de amônio 10% em água destilada), 20 mL da solução B (azul brilhante de Coomassie G-250 2,5% diluído em água destilada) e 100 mL de metanol, os géis ficaram nessa solução de coloração por 16 horas. Após serem corados, os géis foram transferidos para o tampão de neutralização (Tris-Base 0,1 M pH 6,5 ajustado com ácido orto-fosfórico) por 3 minutos. Em seguida, foram lavados em metanol 25% e colocados em solução estabilizante (sulfato de amônio 5% diluído em água destilada) até a foto documentação ou retirada dos *spots*.

As análises de ponto isoeletrico (pI) e de massa molecular (MW) de cada *spot* foram realizadas no programa Image Master 2D Platinum 7 da GE Healthcare, e as imagens analisadas foram obtidas através do scanner ImageScanner III LabSacan 6.0 da GE Healthcare.

4.5 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE GLICOSILAÇÃO DA HEMOLINFA DE *L. intermedia*

Para identificação do perfil de glicosilação foi necessário primeiramente realizar a separação das proteínas por massa molecular em gel gradiente desnaturante de poliacrilamida 5-15%. Em seguida as proteínas foram submetidas a uma nova corrente elétrica, para serem transferidas para uma membrana de nitrocelulose (Whatman), com aplicação de voltagem constante (100 V) por 1,5 horas em tampão de transferência. Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau-S para verificar a eficiência da transferência e localização das proteínas. Deste modo, as proteínas separadas em bandas pela eletroforese e fixadas na membrana de nitrocelulose, permitem a realização do imunoensaio com lectinas (DIG - *Glycan Differentiation Kit* da Roche).

Foi realizado o bloqueio de sítios inespecíficos da membrana com TBS (Tris HCl 50 mM pH 7,5; NaCl 0,15 M) contendo caseína (3%) por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida a nitrocelulose foi incubada (por 1h em temperatura ambiente) com as diferentes lectinas do kit. Lectina GNA, que identifica resíduo de açúcares do tipo alta manose, lectina SNA que reconhece ácido siálico, lectina PNA que se liga a galactose- β (1-3)-N-acetilgalactosamina e lectina DSA que reconhece galactose- β (1-4)-N-acetilglucosamina. As lectinas foram utilizadas de acordo com as instruções do fabricante. As lectinas GNA, SNA e DSA foram utilizadas na diluição de 1:1000, enquanto a lectina PNA foi utilizada na diluição de 1:100. Para identificação de carboidratos com a lectina PNA, é necessário retirar resíduos de ácido siálico com neuroaminidase (instrução do fabricante), contudo esse tratamento não foi realizado. Dados anteriores mostraram que a hemolinfa não contém ácido siálico (resultado negativo com a lectina SNA que reconhece ácido siálico).

Após incubação com as lectinas, as membranas foram lavadas três vezes com tampão TBS e uma vez com TBS contendo $MnCl_2$ 1 mM, $MgCl_2$ 1 mM e $CaCl_2$ 1 mM. Em seguida, foram incubadas (1 hora em temperatura ambiente) com anticorpo secundário anti-digoxigenina conjugada à fosfatase alcalina (1:1000). Após três lavagens com TBS e uma lavagem com tampão

ótimo para atividade da fosfatase alcalina (Tris-HCl 100 mM pH 9,5; NaCl 100 mM e MgCl 5 mM), a reação foi revelada com o substrato BCIP (Promega) e o cromógeno NBT (Promega) em tampão ótimo para fosfatase alcalina.

4.6 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA DE ALTA RESOLUÇÃO

Essa etapa foi realizada em colaboração com o professor Dr. Marcos Sergio de Toledo do Setor de Imunoquímica de Glicoconjugados, no Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo.

A coleta de hemolinfa e a separação celular ocorreram da forma descrita nos itens 4.1 e 4.2 deste Material e Métodos, respectivamente. Foi utilizado um pool de hemolinfa de 30 aranhas (machos e fêmeas), coletadas em PBS sem adição de CIP, o que poderia interferir nas análises lipídicas.

A extração dos lipídios foi realizada utilizando o solvente orgânico MTBE (*Methyl-Tert-Butyl Ether-MTBE* da Sigma), seguindo o protocolo de Matyash *et al.*, 2008. O volume de amostra utilizado foi de 250 µL, tanto da fração celular, como da fração livre de células. Em tubos de vidro contendo as amostras, foi adicionado 1,5 mL de metanol puro (Vetec), seguido de 5 mL de MTBE, a solução ficou sob agitação por 1 hora em temperatura ambiente. Adicionalmente um banho de ultrassom foi utilizado por 30 segundos em intervalos de 15 minutos. Para induzir a formação de fases foi adicionado 1,25 mL de água ultrapura, aguardou-se 10 minutos, e em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 1000xg. A fase superior (orgânica) foi coletada com pipeta Pasteur de vidro, e armazenada em novo tubo (MATYASH *et al.*, 2008).

As amostras da fração orgânica e da fração solúvel foram secas em fluxo de nitrogênio líquido acoplado a banho-maria 37°C. Então, as amostras foram ressuspensas em 100 µL de clorofórmio/ metanol (2:1 v/v).

Foram realizados ensaios de separação cromatográfica a fim de identificar o conteúdo lipídico das amostras (fosfolipídios, glicolipídios e esteróis). Foram utilizadas placas de sílica 60 para cromatografia em camada delgada de alta resolução- HPTLC (do inglês, *High Performance Thin Layer*

Chromatography, Merck), onde é possível uma análise rápida e quantitativa de amostras complexas, sendo que o tamanho de partícula médio é de 5-6 μm . Isso resulta numa superfície mais homogênea e em um poder de separação maior do que o oferecido por placas convencionais de TLC (do inglês, *Thin-Layer Chromatography*).

Para identificação dos hidrocarbonetos de todas as classes de lipídios foi utilizada a primulina 0,01%, em seguida, as placas foram analisadas com luz UV ($\lambda=254\text{ nm}$), em sistema de captura de imagem (GBOX Syngene),

Para detecção e identificação dos fosfolipídios, foi utilizado 10 μg de cada padrão de fosfolipídio, sendo a Fosfatidiletanolamina (PE), Fosfatidilcolina (PC), Fosfatidilserina (PS) e Fosfatidil-inositol (PI). A fase móvel foi realizada com Cloroformio/Metanol/Metilamina 40% (65:35:10 v/v/v). As amostras foram reveladas com primulina 0,01% (50 mg/100 mL acetona:água, 80:20, v/v). Para revelação do grupamento fosfato, as amostras foram borrifadas com revelador comercial azul de Molibdênio (Sigma).

Para a detecção dos glicolipídios, as amostras foram comparadas com os padrões Ceramida Monohexosil (CMH), Ceramida Dihexosil (CDH), Ceramida Trihexosil (CTH), Globosideos (GLOBO) e Gangliosídios (GGS). A fase móvel foi realizada com Clorofórmio/ Metanol/ Cloreto de cálcio 0.02% (60:40:9 v/v/v). Para identificação dos anéis de esteróis, as amostras foram borrifadas orcinol/ H_2SO_4 (ácido orselínico 0,5% em H_2SO_4 3 M) e a placa foi aquecida em estufa a 120°C por 5 minutos (TOLEDO *et al.*, 2001)

Para a detecção dos esteróis, foi utilizado como padrões o Triacilglicerol (TAG) 10 μg ; Colesterol (COL) 5 μg e Ergosterol (ERG) 10 μg . A mistura de solventes utilizada para fase móvel foi Hexano/Éter Etílico/Ácido acético (80:20:1 v/v/v). Para identificação da parte glicídica foi borrifado ácido sulfúrico 2M e a placa foi aquecida em estufa 120°C por 5 minutos (CHAIM *et al.*, 2011b).

4.7 PREPARAÇÃO DAS LAMINAS PARA IDENTIFICAÇÃO DOS HEMÓCITOS

A hemolinfa foi coletada em PBS contendo 5% de CIP e para confecção de quatro laminas foi utilizada hemolinfa extraída de 30 aranhas adultas (fêmeas e machos). O número de células foi contado em câmara de Neubauer, com contagem dos quatro quadrantes principais. O número de células obtido a cada coleta era de 5×10^4 células/mL. Para concentração das células em laminas histológicas foi utilizada citocentrífuga Cytospin (Shandon Cytospin 3) do laboratório de Citologia Clínica da Universidade Federal do Paraná, em colaboração com a professora Dr^a. Almeriane Maria Weffort Santos.

Uma vez que a quantidade de células adquiridas era baixa, ensaios preliminares foram realizados para se estabelecer o número de células/lâmina necessário para análise dos hemócitos. Determinou-se que eram necessários 5×10^4 hemócitos por lâmina para análise dos hemócitos. Após a concentração das células em citocentrífuga foi realizada a fixação utilizando metanol 100% (Vetec) por 3 minutos.

Para analisar a morfologia das células, as lâminas foram coradas com May-Grunwald Giemsa. Primeiramente, as lâminas foram coradas com corante concentrado de May-Grünwald por 3 minutos, em seguida foi acrescentado sobre o corante aproximadamente 300 μ L de água destilada pH 7,0. As lâminas permaneceram com a solução diluída do corante de May-Grünwald por mais 1 minuto. O corante foi descartado e sem lavar as lâminas, essas foram coradas com Giemsa, diluído previamente em água destilada na proporção 1:20 (v/v). O Giemsa ficou em contato com as células por 15 minutos, após esse tempo as lâminas foram lavadas em água corrente.

Além do metanol, outros fixadores também foram testados, como o Glutaraldeído 2% por 2 horas, o Baker 10% (formol-cálcio) 12 horas, o Álcool etílico: Éter etílico 1:1 (5 minutos), o Álcool etílico 95° (5 minutos) e algumas lâminas foram fixadas ao ar livre (15-30 minutos).

As lâminas foram analisadas em microscópio de luz binocular Olympus BX40 com câmera de captura de imagem p071.

A identificação e classificação dos hemócitos da hemolinfa de *L. intermedia* foram realizadas com base na literatura, principalmente, duas referencias bibliográficas foram utilizadas: CHAPMAN (1982) e GUPTA (2009).

A porcentagem de cada tipo celular foi determinada a partir de 10 laminaas, onde o total de células verificadas foi de 602.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PADRONIZAÇÃO E ESTABELECIMENTO DO MÉTODO DE COLETA DE HEMOLINFA DE *Loxosceles intermedia*

Nosso primeiro desafio no estudo da hemolinfa de *Loxosceles intermedia* foi a padronização da metodologia para a coleta deste material. Diferentes protocolos para a coleta de hemolinfa podem ser aplicados quanto à anestesia, à manipulação dos artrópodes e à coleta. Além disso, vários métodos para a separação de seus componentes são descritos na literatura. A escolha de uma determinada metodologia dependerá do objetivo de cada estudo. Na maioria das vezes, a coleta da hemolinfa é letal para o animal, principalmente para aracnídeos e insetos pequenos (RIMOLDI *et al.*, 1989). Geralmente, as formas de obtenção da hemolinfa são manuais, utilizando seringa e agulha ou seccionando as pernas do animal e coletando a hemolinfa com o auxílio de uma micropipeta. O procedimento de coleta é sempre realizado na presença de anticoagulantes (SILVA JUNIOR, 2000; YİĞİT; BENLİ, 2008; JALAL *et al.*, 2010; TRABALON *et al.*, 2010).

Os principais anticoagulantes utilizados para coleta de hemolinfa são N-acetil-L-cisteína e heparina, ambos na molaridade de 5 mM (RIMOLDI *et al.*, 1989; ZACHARIAH *et al.*, 2007) ou tampão citrato de sódio pH 4,6, contendo NaCl 0,45 M; glicose 0,1 M; citrato trissódico 30 mM; ácido cítrico 26 mM; EDTA 10 mM (SILVA JUNIOR, 2000; FUKUZAWA *et al.*, 2008 e TRABALON *et al.*, 2010). Dependendo do objetivo experimental, a hemolinfa não pode ser coletada com coquetéis de inibição que contenham quelantes como anticoagulantes, ou na presença de proteínas que inibam a ação de proteases ou que inibam a oxidação, e nesses casos, uma boa alternativa é a coleta em solução salina (0,3 M de NaCl, 0,025 M de KCl, 1,44 mM de CaCl₂, 0,047 mM de NaHCO₃ em 100 mL de água destilada) (YİĞİT; BENLİ, 2008).

Sabe-se que a hemolinfa dos artrópodes tem como sinalização inicial para coagulação, a clivagem da pro-fenoloxidase em fenoloxidase por ação das proteases da hemolinfa, portanto um coquetel de inibidor de proteases é

adequado para evitar a coagulação da amostra (SILVA JUNIOR, 2000; JIRAVANICHPAISAL *et al.*, 2006).

Inicialmente, a metodologia utilizada para coleta de hemolinfa de *L.intermedia* foi a secção da região patelar das pernas de cada aranha (Figura 5A). A hemolinfa foi impulsionada para o local seccionado por estímulo de eletrochoque (15V) (Figura 5B) e, em seguida, foi coletada com auxílio de micropipeta (Figura 5C). Depositada em microtubo com PBS e 5% de CIP (do inglês, *Protease inhibitor cocktail for mammalian tissues*, Sigma). Com essa metodologia foi possível coletar cerca de 2 a 5µl de hemolinfa de cada aranha.

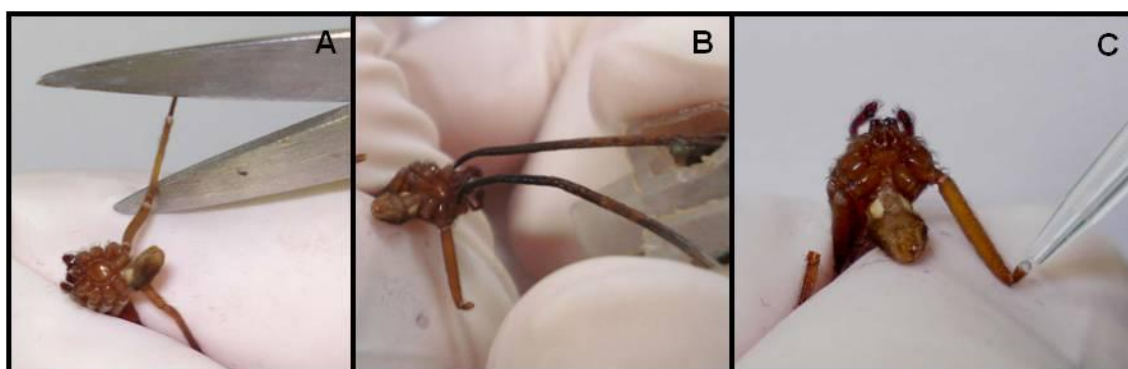


Figura 5- Coleta de hemolinfa de *L. intermedia*. A: Local de secção na região patelar; B: estímulo por eletrochoque; C: coleta de hemolinfa da perna com auxílio de micropipeta.

Rimoldi e colaboradores (1989) relatam uma modificação da metodologia de secção da região patelar das pernas na coleta da hemolinfa do barbeiro (*Triatoma infestans*). Os autores seccionaram todas as pernas e submeteram o animal à centrifugação em 120xg por 1 minuto a 4°C. Contudo, essa modificação não se mostrou adequada para coleta de hemolinfa de *L. intermedia*. Além de um baixo rendimento, foi observada no decorrer da coleta a coagulação da hemolinfa, fato que poderia interferir nas análises posteriores. Portanto, houve a necessidade em buscar uma nova metodologia para coleta.

Nos artrópodes, a coleta de hemolinfa também já foi realizada por punção do dorso, em abelhas (CHAN *et al.*, 2006) e em aranhas (FUKUZAWA, 2007). Essa segunda metodologia foi melhor em relação ao rendimento, a coleta de hemolinfa da aranha-marrom foi realizada pela punção do vaso dorsal e obtivemos um rendimento satisfatório, com volume de 8 a 12 µl de hemolinfa

por aranha. Para essa metodologia a agulha utilizada foi previamente ambientada com cerca de 2 μ L de PBS contendo 5% do CIP. Outro parâmetro alterado na metodologia inicial foi o procedimento de anestesia do animal. Pois com esse novo método a aranha deveria ser imobilizada com a região dorsal voltada para cima e, sabendo-se que aranha-marrom é venenosa, esta manipulação poderia ser perigosa.

No trabalho de Rimoldi e colaboradores (1989) os artrópodes foram anestesiados com baixas temperaturas (-20°C) por poucos minutos, em outros trabalhos foi utilizado o gás dióxido de carbono por um ou dois minutos (CARREL, 1990; TILLINGHAST; TOWNLEY, 2008). Há ainda descrita anestesia de artrópodes utilizando resfriamento 4°C por uma hora (TRABALON *et al.*, 2010), com uso de éter (ZACHARIAH *et al.*, 2007; YİĞİT; BENLİ, 2008) ou álcool (JALAL *et al.*, 2010). No trabalho de Zachariah e colaboradores (2007) foi utilizado isoflurane 5% para anestésias aranhas (*Theraphosa blondi* e *Grammostola rosea*) com o objetivo de estudar a bioquímica da hemolinfa, nesse caso as aranhas puderam ser recuperadas após a coleta da hemolinfa.

Em seguida, foi testado o método para coleta da hemolinfa de *L. intermedia* o método de anestesia por resfriamento, descrito anteriormente em alguns trabalhos (SILVA JUNIOR, 2000; FUKUZAWA, 2007 e TRABALON *et al.*, 2010). Entretanto, o resfriamento tornou a hemolinfa de *L. intermedia* viscosa e o rendimento da coleta foi bastante reduzido. Sendo assim, testamos o clorofórmio em temperatura ambiente, procedimento que se mostrou o mais adequado.

Estabeleceu-se assim que a metodologia mais adequada para coleta da hemolinfa de *L. intermedia* foi a anestesia com clorofórmio, seguida de imobilização (realizada sobre a bancada com uso de fita adesiva) de forma que a região dorsal ficasse voltada para cima (Figura 6A). A coleta da hemolinfa foi realizada com agulha, ambientada com PBS contendo 5% do CIP. Para coleta, a agulha foi inserida na região final do cefalotórax, mais próxima do abdômen (Figura 6B e C), e a hemolinfa foi extraída do vaso dorsal principal (Figura 7). A hemolinfa coletada foi depositada em microtubos de 1.5 mL com 20 μ L de PBS

e 5% de CIP, em seguida, armazenada em freezer -20°C até o momento do uso.

A hemolinfa não deve ser armazenada por mais de um mês, pois após esse período observou-se a degradação das proteínas, inviabilizando os estudos (resultados não mostrados). Sendo assim, a coleta foi realizada mensalmente, ou quando houve a necessidade de mais amostras, de acordo com a programação experimental.

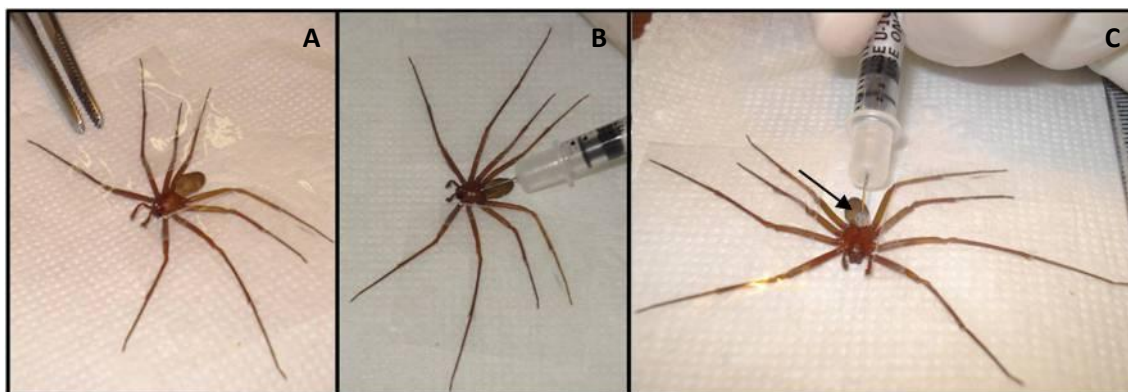


Figura 6- Coleta da hemolinfa de aranha-marrom. A: Imobilização; B: Local onde a agulha deve ser inserida para coleta da hemolinfa; C: momento da perfuração do exoesqueleto e escoamento da hemolinfa na seta.

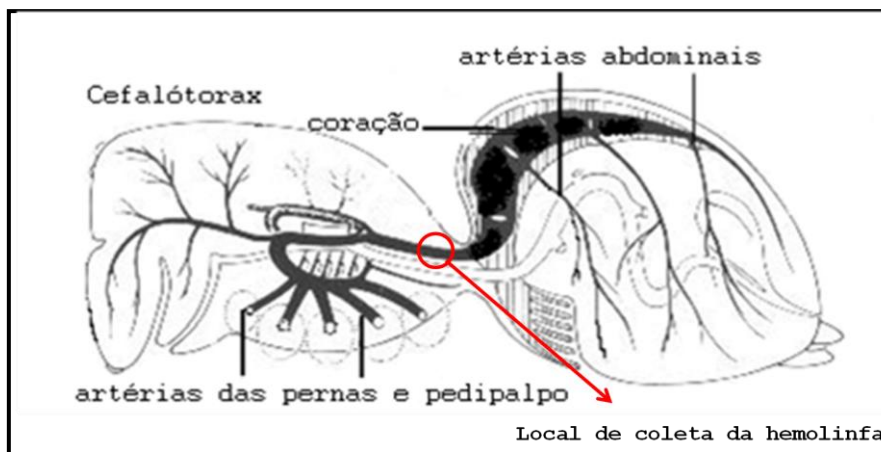


Figura 7- Ilustração do local para coleta da hemolinfa. Adaptado de Foelix (1996).

5.2 PERFIL PROTEICO DA HEMOLINFA DE *L. intermedia*

A quantidade de proteínas totais da hemolinfa não está somente relacionada à dieta que os artrópodes adquirem, mas também às necessidades

de cada espécie (CAPPELARI *et al.*, 2009). Por exemplo, abelhas africanizadas possuem quantidades maiores de proteínas totais que *Apis mellifera carniça* (subespécie), quando mantidas sob influência da mesma dieta alimentar. Ou seja, a quantidade de proteínas totais pode variar de acordo com a espécie do artrópode (CAPPELARI *et al.*, 2009).

A dosagem proteica da hemolinfa de *L. intermedia* foi realizada a cada coleta. A dosagem proteica foi determinada pelo método de Bradford (1976). Em média a hemolinfa de aranhas-marrons continha 25 µg/µL de proteínas totais. A hemolinfa de *Rhipicephalus sp.* (carrapato) contém quantidade de proteínas totais pouco maiores do que o encontrado na hemolinfa de *L. intermedia*. Na hemolinfa do carrapato a concentração de proteínas totais foi de cerca de 35 µg/µL (ANGELO *et al.*, 2010).

Para analisar o perfil proteico da hemolinfa de *L. intermedia*, as proteínas totais foram submetidas à eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) sob condições redutoras e não redutoras. Diferentes concentrações da mistura de acrilamida foram testadas para estabelecer a porcentagem que resultava em uma melhor representação do perfil proteico completo da hemolinfa, abrangendo proteínas de alta e baixa massa molecular (dados não mostrados). Sendo assim, o gel gradiente de 5% a 15% foi o que se mostrou mais adequado. Os géis foram corados por coloração monocromática de prata ou coloração com azul brilhante de Coomassie R-250.

Os géis contendo as proteínas totais da hemolinfa de *L. intermedia* corados por azul brilhante de Coomassie R-250 (Figura 8A) destacaram a presença de uma região compatível com subunidades de hemocianina na região de 70 kDa. Como já discutido anteriormente, a hemocianina possui alta representatividade na hemolinfa de vários artrópodes (RUPPERT *et al.*, 2005). A coloração dos géis com impregnação de prata (Figura 8B) revelou um perfil proteico mais completo, principalmente para proteínas menores que 66 kDa, pois essa técnica possui maior sensibilidade (detecção ~1 ng), logo é capaz de revelar bandas não perceptíveis à coloração de Coomassie Blue (detecção ~100 ng).

A análise dos géis de proteínas totais da hemolinfa de *L. intermedia* revela a banda com grande representatividade na altura de 66 kDa e tal mobilidade eletroforética aparente é compatível com subunidades de hemocianina. A hemocianina pode estar organizada hexâmeros simples ou múltiplos de hexâmeros. Cada subunidade possui cerca de 72 kDa e dobra-se em três domínios bem caracterizados. O domínio I com cinco ou seis α -hélices, o II com quatro α -hélices e o domínio III possui o sítio ativo associado a dois íons de cobre, com sete folhas β antiparalelas (Figura 2) (DECKER *et al.*, 2007).

O gel da hemolinfa total de *L. intermedia*, corado por prata, apresentou bandas com variadas mobilidades eletroforéticas aparentes, com proteínas de alta massa molecular (acima de 200 kDa) e também proteínas de baixa massa molecular (abaixo de 29 kDa) (Figura 8B).

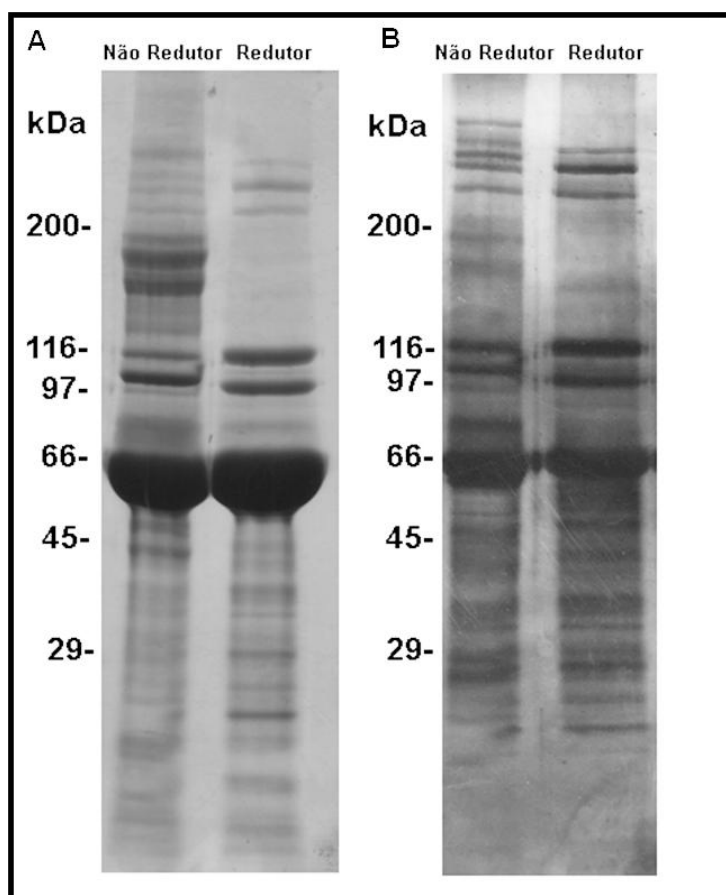


Figura 8 - Perfil proteico da hemolinfa total de *L. intermedia* em SDS-PAGE (gradiente de acrilamida: 5-15%). Hemolinfa foi coletada em PBS com 5% de CIP, com tampão de amostra não redutor ou redutor. A: contém 30 μ g de proteínas totais coradas com Coomassie Blue R-250; B: contém 3,5 μ g de proteínas totais submetidas à impregnação por nitrato de prata.

Trabalon e colaboradores (2010) analisaram o perfil proteico da hemolinfa de *Brachypelma albopilosa* (aranha), em gel gradiente de 10-15%, e o perfil apresentado foi semelhante ao de *L. intermedia* com três bandas características. Duas predominantes em 116 e 97 kDa, e uma banda maior na região de 66 kDa (Figura 9). Os perfis se diferem quanto às outras proteínas, na hemolinfa de *B. albopilosa* aparentemente tem uma abundancia de proteínas acima de 100 kDa, e no perfil de *L. intermedia* há bandas de alta massa bem características, porém ocorrem várias bandas abaixo de 66 kDa (Figura 8).

Com auxílio da espectrometria de massas, Trabalon e colaboradores (2010) identificaram subunidades de hemocianina, em regiões de 70, 35 e 65 kDa e algumas acima de 100 kDa. Como o perfil da hemolinfa de *L. intermedia* apresentou bandas análogas, principalmente a banda de maior representatividade na região de 66 kDa (Figura 8), podemos sugerir fortemente que se trata da hemocianina.

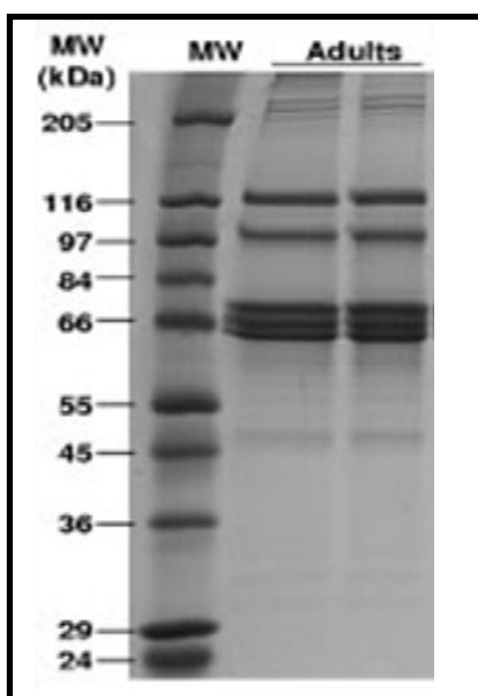


Figura 9 - Perfil proteico da hemolinfa total de aranhas fêmeas *Brachypelma albopilosa*. em SDS-PAGE (gradiente de acrilamida: 10-15%). Contendo 20 µg de proteínas totais coradas com Coomassie Blue coloidal (G 250). Adaptado de TRABALON *et al.* (2010).

O avanço nas técnicas de análises de amostras biológicas permite que o estudo da hemolinfa seja mais completo e específico. A utilização das técnicas de gel bidimensional e espectrometria de massas estão sendo cada vez mais aplicadas e poucos artigos avaliam o perfil proteico de hemolinfa unicamente por gel unidimensional.

5.3 PERFIL PROTEICO DA HEMOLINFA DE *L. intermedia* EM GEL BIDIMENSIONAL (2D)

A análise do gel 2D da hemolinfa total de *L.intermedia* por coloração de azul brilhante de Coomassie G-250 revelou aproximadamente 110 *spots* de proteínas, com pontos isoelétricos variando do pH ácido ao neutro (Figura 10). A fim de facilitar a identificação dos *spots*, a figura 11 mostra o mesmo gel de pH 3-10 com os respectivos pontos isoelétricos relatados na tabela 1. As massas moleculares das proteínas da hemolinfa no gel bidimensional variaram entre proteínas pouco maiores de 100 kDa até proteínas menores do que 29 kDa. Enquanto que no gel unidimensional também são vistas proteínas maiores que 200 kDa. Essa diferença ocorreu devido ao fato de que o gel unidimensional foi um gel gradiente que permite as proteínas maiores que 200 kDa entrem na malha, enquanto a segunda dimensão do gel 2D as proteínas foram submetidas a uma malha uniforme de 10% de acrilamida.

Outra característica observada na figura 10 é a formação de uma “linha” de proteínas na região de 66 kDa, como há poucos estudos de proteômica da hemolinfa de outros artrópodes não há como afirmação que são proteínas fosforiladas ou glicosiladas, porém em outros géis que retratam os perfis de em duas dimensões geralmente ocorre esse tipo de formação em proteínas que são modificadas co-traducionalmente ou pós-traducionalmente.

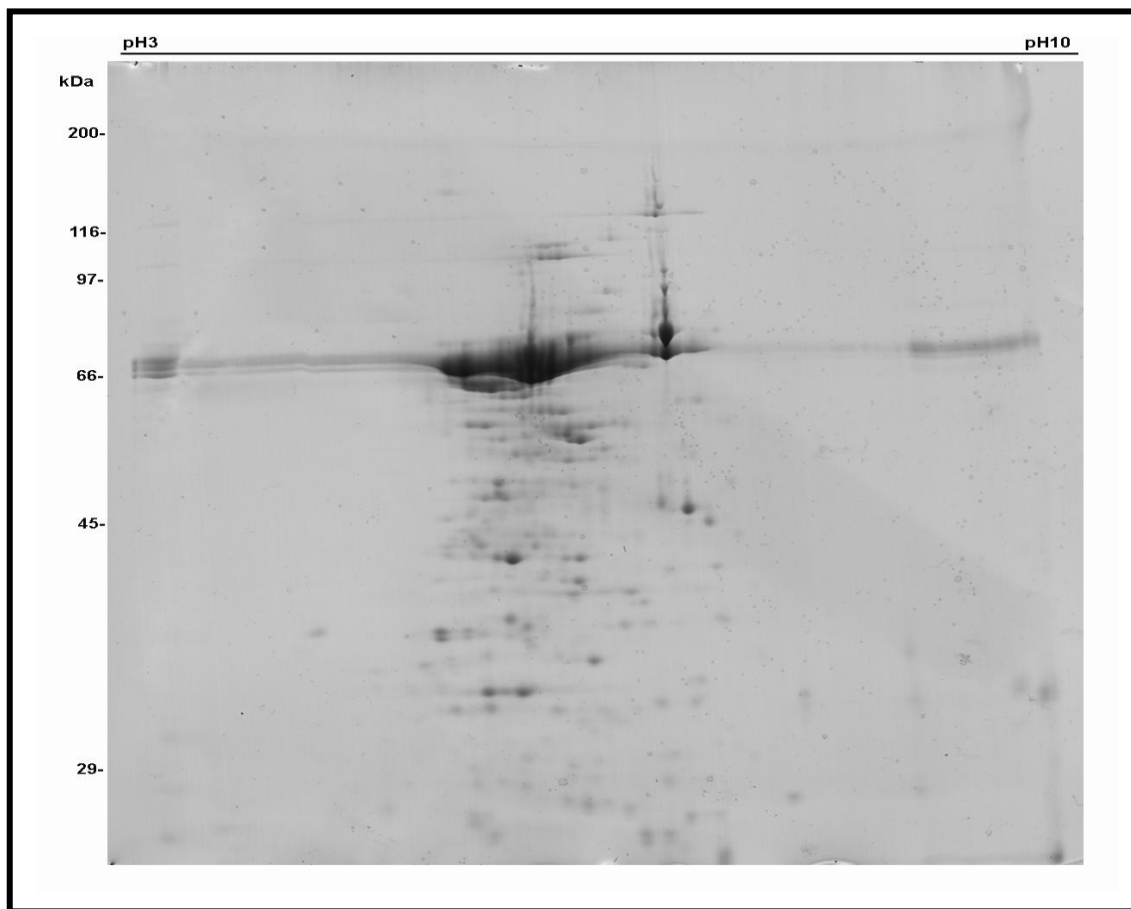


Figura 10- Perfil da hemolinfa total de *L. intermedia* (100 μ g) em gel bidimensional com malha de 10% em SDS-PAGE, pH 3-10. Hemolinfa foi coletada diretamente no tampão de reidratação e dosadas por 2D-Quant Kit (GE). Para a separação das proteínas por massa molecular, realizada após a focalização, foi utilizado gel de SDS-PAGE 10% e a coloração realizada foi Coomassie. Indicadores de massas moleculares à esquerda.

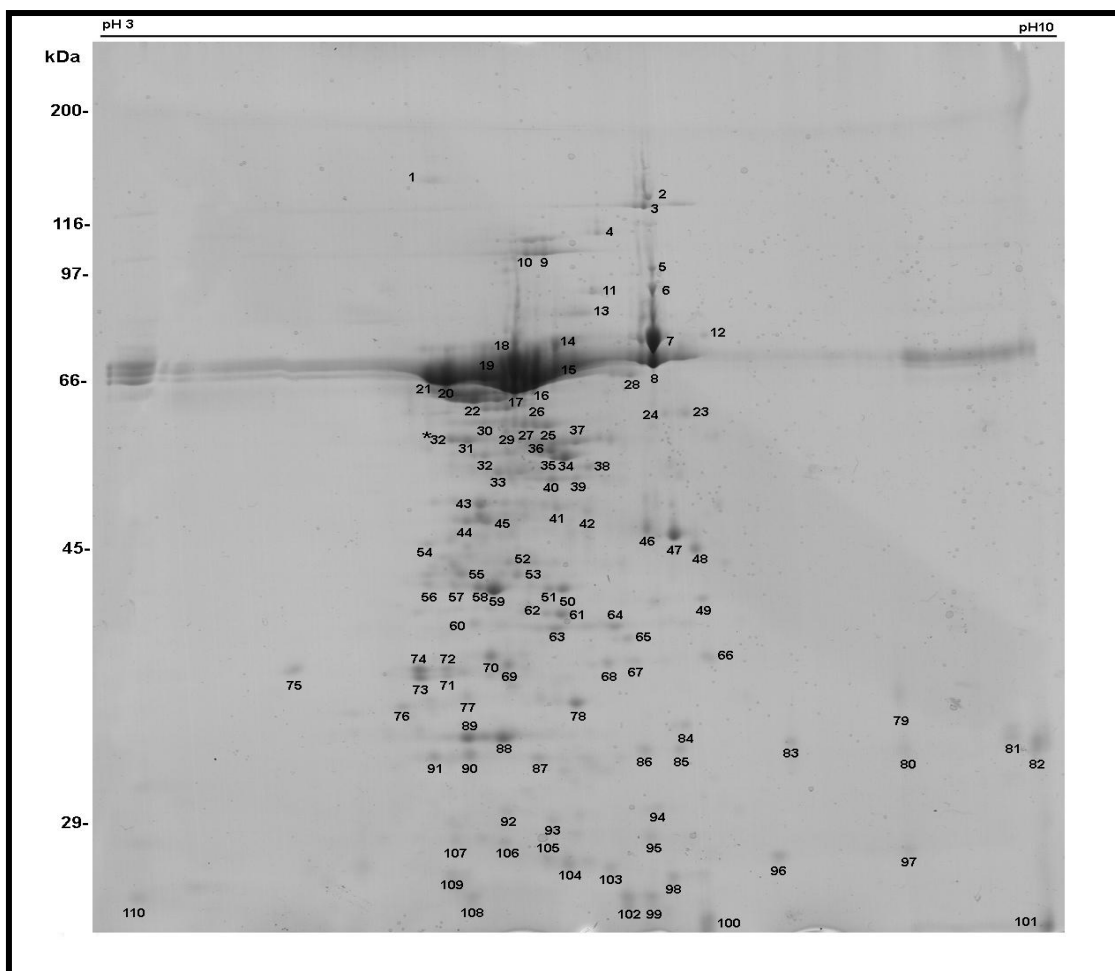


Figura 11- Perfil da hemolinfa total de *L. intermedia* em gel bidimensional com malha de 10% em SDS-PAGE, pH 3-10, os números identificam os *spots* referentes à tabela 1. Indicadores de massas moleculares à esquerda.

Spot	pI	MM	Spot	PI	MM	Spot	pI	MM
1	5.50	139	37	6.57	56	74	5.36	36
2	7.15	126	38	6.66	53	75	4.43	36
3	7.12	121	39	6.57	51	76	5.23	34
4	6.76	110	40	6.39	51	77	5.72	35
5	7.17	98	41	6.42	48	78	6.53	34
6	7.17	90	42	6.49	47	79	8.95	35
7	7.17	73	43	5.84	48	80	9.00	32
8	7.16	68	44	5.74	46	81	9.80	32
9	6.37	103	45	5.86	46	82	9.99	32
10	6.23	103	46	7.09	45	83	8.15	32
11	6.72	90	47	7.29	45	84	7.35	33
12	7.55	75	48	7.45	44	85	7.31	32
13	6.64	83	49	7.50	40	86	7.04	32
14	6.43	73	50	6.45	41	87	6.24	32
15	6.43	66	51	6.35	41	88	5.98	33
16	6.28	65	52	6.05	43	89	5.72	33
17	6.12	63	53	6.11	42	90	5.73	32
18	6.12	69	54	5.45	44	91	5.46	32
19	5.89	65	55	5.69	42	92	6	29
20	5.61	65	56	5.44	42	93	6.34	29
21	5.49	65	57	5.64	41	94	7.13	29
22	5.82	62	58	5.82	41	95	7.07	28
23	7.40	60	59	5.94	41	96	8.03	27
24	7.25	60	60	5.78	39	97	9.01	27
25	6.35	58	61	6.43	40	98	7.23	26
26	6.27	58	62	6.33	40	99	7.07	25
27	6.19	58	63	6.39	39	100	7.49	24
28	6.99	65	64	6.84	39	101	10	24
29	6.05	57	65	6.93	38	102	6.89	25
30	5.89	59	66	7.53	37	103	6.76	27
31	5.76	56	67	6.98	37	104	6.45	27
*32	5.64	56	68	6.78	37	105	5.29	27
32	5.88	54	69	6.03	37	106	5.98	28
33	5.98	52	70	5.90	37	107	5.60	28
34	6.49	54	71	5.57	36	108	5.73	25
35	6.41	54	72	5.57	36	109	5.57	26
36	6.39	55	73	5.37	36	110	3.21	26

Tabela 1- Números dos *spots* com seus pontos Isoelétricos (pI) e massas moleculares (MM) respectivos, baseados no gel bidimensional pH 3-10 da Figura 8.

Como o perfil de proteínas da hemolinfa de *L. intermedia* não era conhecido em gel bidimensional, os géis foram realizados em duas condições diferentes: gradientes de pH 3-10 e 4-7. O gradiente de pH 3-10 normalmente é utilizado para amostras complexas ou desconhecidas. Quando o perfil foi analisado nesse gradiente percebeu-se que havia um acúmulo de proteínas mal resolvidas próximas à faixa ácida até a neutra (Figura 10). Portanto, realizamos a eletroforese em gel bidimensional em gradiente de pH 4-7 (Figura 12). Porém, como pode ser observado, a melhor representação do perfil proteico da hemolinfa de *L. intermedia* foi obtida com o gel em gradiente de pH 3-10, nas condições experimentais utilizadas neste trabalho.

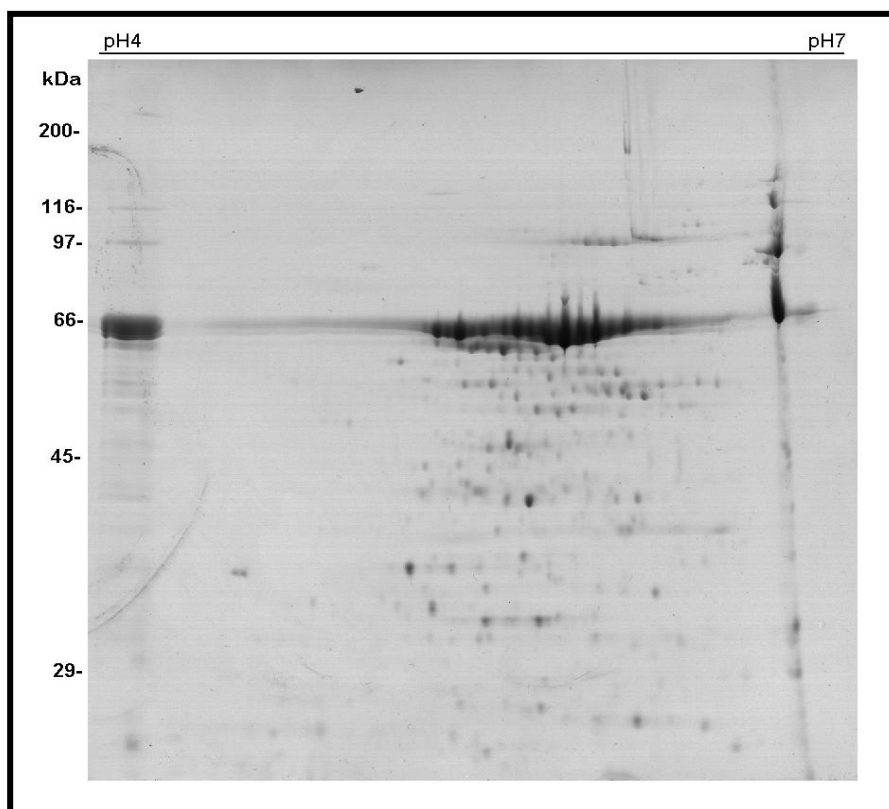


Figura 12- Perfil da hemolinfa total de *L. intermedia* em gel bidimensional com malha de 10% em SDS-PAGE, pH 4-7. Indicadores de massas moleculares à esquerda.

Os géis 2D confirmaram o perfil proteico unidimensional que evidenciou que as proteínas totais da hemolinfa possuem um perfil com massas moleculares altas e baixas. Além disso, foi possível identificar os pontos isoelétricos de cada proteína. Nos géis 2D a região mais representativa foi a da hemocianina em aproximadamente 66 kDa, assim como nos géis

unidimensionais. Para confirmação da identidade destas proteínas, assim como da hemocianina, será necessário realizar a espectrometria de massas.

Considerando que a hemolinfa pode ser comparada ao plasma humano, contendo uma quantidade e variedade de proteínas muito grande, o gel 2D proporciona uma alta resolução, pois proteínas são separadas a partir de duas características físico-químicas das proteínas, seu ponto isoelétrico e massa molecular, porém na separação em géis bidimensionais pode ocorrer de um mesmo *spot* conter mais de um tipo de proteína. Isso ocorre devido a vários fatores, um deles é a quantidade de proteínas em um mesmo ponto isoelétrico (pI) e com mesma massa molecular. Essas características dificultam a análise dos *spots* pela espectrometria de massas, pois devido à baixa resolução há diversas proteínas em um mesmo *spot* (REISINGER; EICHACKER, 2007).

No trabalho de Bogaerts e colaboradores (2009) foi realizado o proteoma da hemolinfa de *Apis mellifera* (abelha). Os autores afirmam que a resolução do gel 2D das proteínas totais da hemolinfa desse animal não ficou adequada. A região mal resolvida no referido trabalho (pH 4 a 7 e 70-60 kDa) é a mesma região em que encontramos baixa resolução em nossos géis bidimensionais com hemolinfa de *L. intermedia*. Nos dois casos foram utilizados géis com o mesmo gradiente de pH (3-10). Mesmo com a baixa resolução do gel 2D da hemolinfa de abelha os autores foram capazes de realizar a espectrometria de massas com ionização e detecção por MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation-Time Of Flight-Mass Spectrometry*) (BOGAERTS *et al.*, 2009). Na hemolinfa das abelhas foram identificados aproximadamente 110 *spots* (BOGAERTS *et al.*, 2009), assim como na hemolinfa total de *L. intermedia* (Figuras 10 e 12). Porém, se compararmos a distribuição dos *spots* dos resultados apresentados por Bogaerts e colaboradores (2009) com os apresentados nesse trabalho observamos diferenças. Bogaerts e colaboradores (2009) apresentam *spots* distribuídos em toda extensão de pH 3-10, enquanto as proteínas da hemolinfa de aranha-marrom estão concentradas na região de pH 5 a 7, aproximadamente. Além disso, na hemolinfa total das abelhas foram identificadas 62 proteínas relacionadas com a defesa imune-inata (BOGAERTS *et al.*, 2009).

Trabalon e colaboradores (2010) também identificaram aproximadamente 100 *spots* na hemolinfa de aranhas *B. albopilosa*, contudo o perfil do gel 2D é relativamente diferente da hemolinfa de *L. intermedia* (Figura 10). No gel 2D de *B. albopilosa* as proteínas foram focalizadas principalmente na região neutra do gel, outra disparidade é que a maior parte das proteínas de *B. albopilosa* foram concentradas na faixa de 200 a 60 kDa, exatamente o oposto do observado com a hemolinfa de *L. intermedia* (figura 10).

Gadwala e colaboradores (2013), comparando vários métodos de solubilização de proteínas totais, encontraram na hemolinfa do bicho da seda (*Bombyx mori*) uma média de 110 *spots*. Além disso, encontram apenas 11 tipos diferentes de proteínas, entre elas inibidores de serino-protease, ubiquitina, lipoproteínas, proteínas associadas a hormônios e proteínas nucleares. Já Pérez-Hedo e colaboradores (2012) ao realizar o proteoma da hemolinfa de *Sesamia nonagrioides* (mariposa) em dois estágios do desenvolvimento, identificaram por espectrometria de massas com ionização e detecção por MALDI-TOF (aquisição de espectros em MS/MS) proteínas com várias funções a partir de 85 *spots* diferentes. A maioria dessas proteínas estava relacionada com processos metabólicos celulares, lipoproteínas, hormônios juvenis e inibidores de serino-protease. Como na hemolinfa de *L. intermedia* não foi possível a realização da análise por espectrometria de massas, não temos dados de identificação das proteínas encontradas na hemolinfa de aranha-marrom.

Trabalon e colaboradores (2010) realizaram a espectrometria de massas da hemolinfa de aranhas *B. albopilosa* em sistema nanoHPLC-Chip. Nessa metodologia, uma cromatografia líquida de alto desempenho é acoplada ao espectrometro. Desta forma, os peptídeos são separados e concentrados de forma eficiente permitindo assim que uma maior quantidade da amostra chegue ao detector. Esse sistema facilita a identificação de proteínas pouco representativas na amostra e, nesse caso, permitiu a identificação das cadeias de hemocianina (YIN; KILLEEN, 2007).

A espectrometria de massas é essencial em trabalhos onde se objetiva conhecer proteínas ainda não descritas. No presente trabalho foram realizados

ensaios piloto de espectrometria de massas de alguns *spots*, com ionização e detecção por MALDI- TOF. A aquisição de espectros foi realizada em MS/MS, e usando o programa MASCOT (*Matrix Science*, UK) os espectros teóricos foram comparados com o banco de dados. Contudo, nenhuma proteína foi identificada. Esse fato está provavelmente relacionado a pouca representatividade de sequências semelhantes no banco de dados de proteínas de hemolinfa de aranhas, uma vez que proteínas de hemolinfa de aranhas são pobremente conhecidas.

5.4 PERFIL DE GLICOSILAÇÃO DAS PROTEÍNAS DA HEMOLINFA DE *L. Intermedia* COM *Lectin-Blot*

Ao contrário da síntese de proteínas que possui sua informação primordial no genoma, o processo de glicosilação ainda é um mistério para ciência, não se sabe exatamente como os carboidratos são cuidadosamente escolhidos durante a formação dos resíduos glicídicos de proteínas e lipídios (ALBERTS *et al.*, 2010). Entretanto, sabe-se que a glicosilação é prevalente em todos os eucariotos, e que tem uma grande importância biológica, participando de vários processos importantes no organismo. Como exemplo, os resíduos de açúcares da glicosilação das proteínas e lipídios participam da comunicação celular e da adesão celular, através de proteínas conhecidas como lectinas, além disso, o glicocálix tem a capacidade de proteger as células contra ação de proteases (ALBERTS *et al.*, 2010).

Para animais do filo dos artrópodes, como as moscas da fruta (*Drosophila sp.*), já se sabe que proteínas contendo resíduos O-ligados β -N-acetilglucosamina (O-GlcNAc) na mesoderme de embriões, são fundamentais no desenvolvimento larval e crescimento de tais insetos (MARIAPPA *et al.*, 2011).

Para algumas proteínas de veneno de aranhas, a glicosilação pode ser indispensável para que a proteína tenha atividade e que o veneno possa assim exercer sua função biológica (VEIGA *et al.*, 1999).

Sendo assim, a identificação dos carboidratos complexos oriundos da glicosilação de proteínas é importante para um trabalho de caracterização. A partir do perfil glicídico, diversas informações sobre os componentes da hemolinfa da *L. intermedia* podem ser agregadas.

Com a reação de *Lectin-Blot* foi possível identificar na hemolinfa de *L. intermedia* os resíduos de N-acetilglucosamina (Figura 13-B) e alta manose (Figura 13-C). Esses resíduos foram identificados nas duas frações: celular e livre de células; bem como na hemolinfa total. Portanto, esses resíduos de açúcar não devem ser provenientes apenas dos glicoconjugados presentes na membrana plasmática dos hemócitos, ainda que uma possível contaminação com membrana celular na fração livre de células não pode ser desconsiderada.

Os resíduos de ácido siálico ou N-acetilgalactosamina não estão presentes nas proteínas de hemolinfa de *L. intermedia*, como também estão ausentes nas proteínas do veneno (Figura 13A). Isto já era esperado, pois os artrópodes da classe Arachnida não apresentam resíduos de glicosilação do tipo ácido siálico (VEIGA *et al.*, 1999; VIMR *et al.*, 2004).

Comparando os nossos resultados obtidos com a hemolinfa com os resíduos encontrados no veneno de *L. intermedia* descrito no trabalho de Veiga *et al.* (1999), é possível afirmar que os mesmos resíduos glicídicos são encontrados tanto em proteínas da hemolinfa quanto em proteínas do veneno. Porém, um resíduo não identificado na hemolinfa, que está presente no veneno de *L. intermedia*, é aquele reconhecido pela lectina PNA, a galactose $\beta(1-3)$ N-acetilgalactosamina. Como comentado na seção de Material e Métodos, a hemolinfa não foi tratada com neuroaminidase, pois não apresentou resultados positivos para ácido siálico (Figura 13A).

Segundo Schenk e colaboradores (2009) as apolipoproteínas da hemolinfa de escorpião da espécie *Pandinus imperator*, são N-glicosiladas com a maior parte dos monossacarídeos sendo de resíduos de alta manose, e galactose. Os autores não identificaram apolipoproteínas com glicosilação do tipo O-ligado, sendo o mesmo observado em nossos resultados com glicoproteínas de hemolinfa de *L. intermedia*. Porém, não identificamos se as proteínas glicosiladas realmente são apolipoproteínas.

Um fato interessante observado no *Lectin-Blot* é que algumas proteínas glicosiladas estão concentradas na fração livre de células, como é o caso da proteína indicada na flecha da figura 13B. Tal fato pode indicar a concentração de glicoproteínas solúveis no plasma, ou ainda indicar um rompimento celular e a parte glicídica estar favorecendo a solubilização da proteína glicosilada, fazendo com que se concentre na fração livre de células.

Outro ponto interessante observado são duas bandas vistas apenas na fração total de hemolinfa (Figura 13C, setas), isso pode sugerir uma degradação de alguns resíduos de açúcares durante a separação das frações. Tal fato poderia ser justificado pelo tempo de exposição à ação de glicosidases presentes na própria hemolinfa, pois o coquetel de proteases não atua sobre as glicosidades. Ainda que todos os cuidados experimentais sejam tomados e a hemolinfa seja mantida em gelo durante todo o procedimento de coleta e separação. Não há na literatura outros trabalhos que abordem o perfil glicídico das proteínas de artrópodes e que poderiam confirmar essa hipótese.

Como nenhum outro trabalho com aranha descreveu proteínas da hemolinfa a esse nível, esse trabalho se torna uma fonte importante de conhecimento sobre o conteúdo proteico da complexa mistura de moléculas que compõem a hemolinfa.

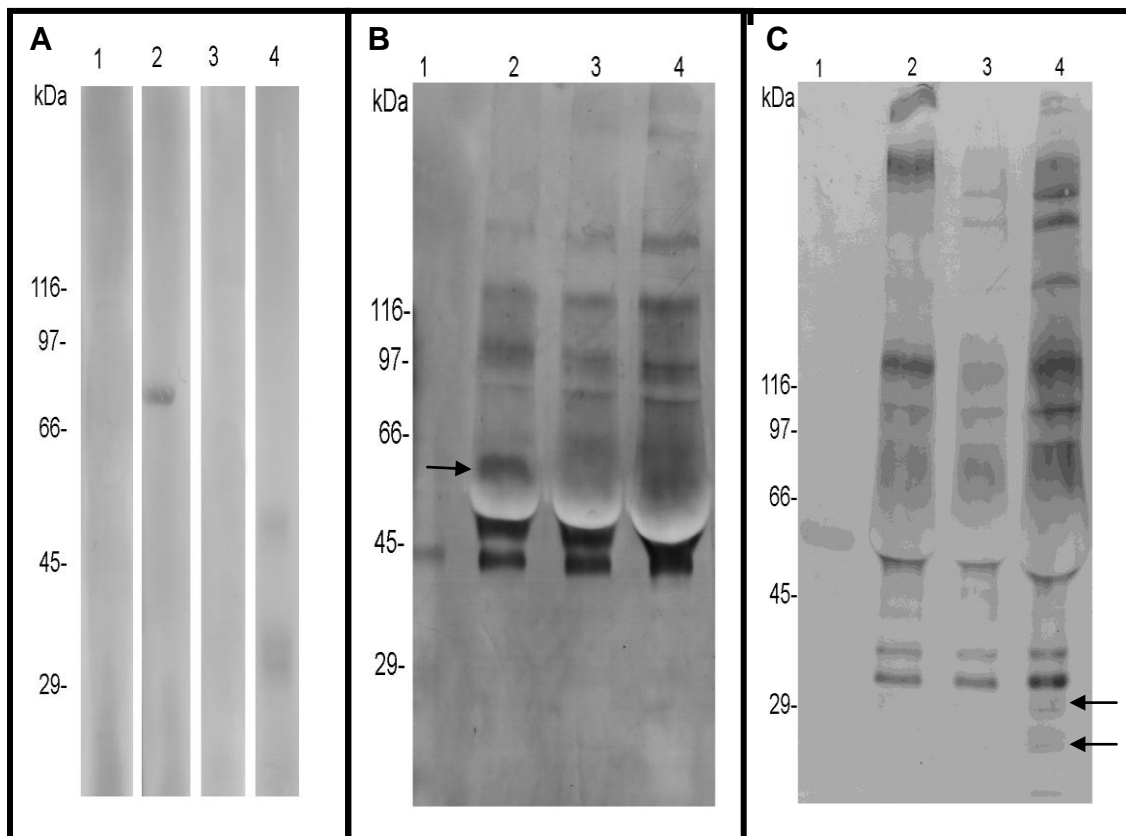


Figura 13- *Lectin-Blot* da hemolinfa de *L.intermedia*. A: hemolinfa total (1) e controle positivo do kit com lectina SNA (2) e hemolinfa total (3) e controle positivo do kit para lectina PNA (4). B: lectina DSA onde (1) controle positivo do kit, (2) fração da hemolinfa livre de células, a seta indica banda vista apenas nessa amostra, (3) fração celular da hemolinfa e (4) hemolinfa total. C: lectina GNA em (1) controle positivo do kit, (2) fração da hemolinfa livre de células, (3) fração celular da hemolinfa e (4) hemolinfa total, a seta indica bandas observadas apenas nessa amostra.

5.5 PERFIL LIPÍDICO DA HEMOLINFA DE *L. intermedia*

Os lipídios são de grande importância para os organismos multicelulares, não só por serem fonte e forma de armazenamento de energia, como também por participarem de eventos de sinalização. Assim, a identificação do conteúdo lipídico presente na hemolinfa, tais como esteróis e fosfolipídios, é de interesse considerável, pois conhecendo a composição lipídica é possível fazer proposições sobre processos metabólicos e funções realizadas pela hemolinfa (FUCHS *et al.*, 2011).

A cromatografia é um método físico-químico de separação. É uma técnica indicada para separação de componentes de uma mistura, e está

fundamentada na migração diferencial dos componentes. A separação ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária. A grande variedade de combinações entre fases móveis (solventes) e estacionárias (sílica) torna a técnica extremamente versátil e de grande aplicação para estudos de caracterização bioquímica de moléculas de origem animal proveniente de líquidos biológicos como a hemolinfa (LEHNINGER *et al.*, 2011).

A cromatografia de camada delgada é um método fácil, barato e muito utilizado para separação de misturas com lipídios, a HPTLC e TLC (*Thin-Layer Chromatography*) são feitas em placas de cromatografia de camada delgada que utilizam a sílica em diferentes tamanhos para separação dos componentes da mistura (LEHNINGER *et al.*, 2011).

A HPTLC tem como principal diferencial da TLC o tamanho das partículas de sílica, que varia de 5-7 μm na HPTLC, enquanto na TLC a partícula varia entre 10-15 μm . Com sílica de menor tamanho a quantidade de solvente usado na fase móvel pode ser diminuída, além de diminuir o tempo de migração e deixar mais sensível o limite de detecção (DEGANI *et al.*, 1998; SHEWIYOA *et al.*, 2012).

Para as análises cromatográficas em placas de HPTLC foram utilizadas as frações separadas (fração livre de células e fração celular) da hemolinfa de *L. intermedia*. As cromatografias revelaram que na fração celular o principalmente fosfolípido é a fosfatidilcolina (PC) e pouco detectável fosfatidilinositol (PI), quando comparada a fração livre de células (Figura 14). O que surpreende, pois é na fração celular que se esperaria identificar um maior número de fosfolípidios, uma vez que esses são constituintes das membranas biológicas.

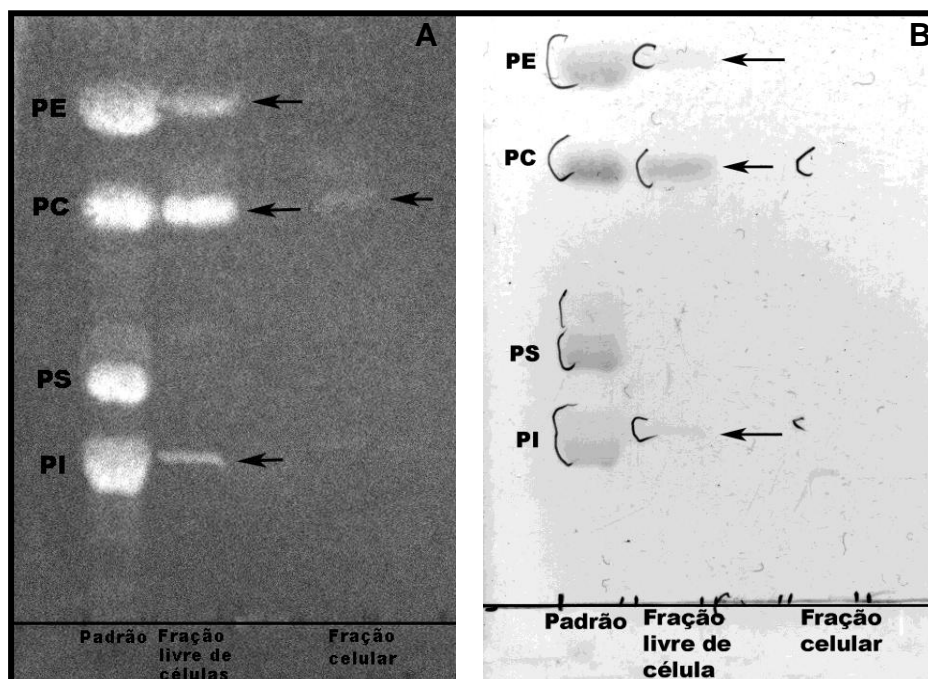


Figura 14- HPTLC das frações lipídicas da hemolinfa de *L. intermedia*, extraída por MTBE e os padrões de fosfolipídios. PE: fosfatidiletanolamina; PC: fosfatidilcolina; PS: fosfatidilserina e PI: fosfatidilinositol. A: revelado com primulina 0,01% e B: revelado com azul de molibdênio. As flechas indicam as reações positivas nas amostras.

A fração livre de células contém, além de PI e PC, fosfatidiletanolamina (PE), revelados por azul de Molibdênio (Figura 14B). Já foi visto em outras espécies de aranhas essa mesma composição de fosfolipídios livres na hemolinfa, porém nesses trabalhos não foi realizada a separação da hemolinfa em frações como realizamos em nosso trabalho (CUNNINGHAM *et al.*, 1994). Cunningham e colaboradores (1994) não realizaram a separação da hemolinfa em frações, mas citam a presença desses fosfolipídios no plasma da hemolinfa de aranha *Polybetes pythagoricus*. Em nosso trabalho optamos pela utilização das frações separadas de hemolinfa, pois dessa forma é possível identificar quais são os componentes lipídicos livres na hemolinfa e os componentes que são celulares.

Os fosfolipídios podem estar livres na hemolinfa, sendo de origem das células do sistema vascular ou mesmo dos hemócitos. No entanto, contaminações não podem ser totalmente descartadas, há a possibilidade que parte seja decorrente do rompimento celular durante a separação das frações; ainda que todo cuidado tenha sido tomado durante a coleta e centrifugação

para manter as células intactas. Nesse ínterim, os lipídios na fração livre de células podem ter realmente outras funções, como por exemplo, de armazenamento lipídico na hemolinfa, já que é sabido que a hemolinfa serve como reguladora da homeostase e armazenadora de energia para épocas de escassez alimentar que os artrópodes possam enfrentar (RUPPERT *et al.*, 2005; GULLAN; CRANSTON, 2008).

Os insetos armazenam os lipídios na forma de triacilglicerol, seja nas células denominadas adipohemócitos ou no corpo gorduroso, porém são carregados na hemolinfa na forma de diacilglicerol por meio das lipoproteínas (CACCIA *et al.*, 2012).

Na hemolinfa de *Drosophila melanogaster*, assim como em outros artrópodes, a maior representatividade de lipídios foi dada pelo diacilglicerol, e o fosfolípido majoritário é a fosfatidiletanolamina (PE) (PALM *et al.*, 2012). Na hemolinfa da aranha *P. pythagoricus*, o fosfolípido mais abundante é a fosfatidilcolina (CUNNINGHAM *et al.*, 1996), assim como foi encontrado na hemolinfa de *L. intermedia*, dado mostrado na figura 14.

Outro motivo pelos qual poderia ocorrer identificação de lipídios na fração livre de células na hemolinfa seria pela presença de hormônios. Hormônios juvenis e de ecdise são encontrados na hemolinfa de várias aranhas, são substâncias essenciais para o crescimento, comportamento de acasalamento e troca de ecdise, esses hormônios possuem uma natureza lipídica, sendo assim passíveis de serem identificados na fração livre de células da hemolinfa (TRABALON *et al.*, 2011).

Lipoproteínas também são comumente encontradas na hemolinfa dos artrópodes, e são responsáveis por transportar lipídios entre os diversos tecidos. As mais comuns são HDL (do inglês, *High-Density-Lipoprotein*-lipoproteína ou lipoproteína de alta densidade) e LDL (do inglês, *Low-Density-Lipoprotein*-lipoproteína ou lipoproteína de baixa densidade) (WELLS *et al.*, 1987; CUNNINGHAM *et al.*, 1994; PALM *et al.*, 2012).

Para detecção dos esteroides, foram utilizados os padrões para triacilglicerol (TAG), colesterol (COL) e ergosterol (ERG) (Figura 15). Esses dois últimos padrões possuem a mesma altura de bandas, logo para a

diferenciação entre esses dois esteroides nas amostras são necessárias análises adicionais por espectrometria de massas.

A fração livre de células da hemolinfa de *L. intermedia* revelou através da HPTLC conter TAG, COL e ERG reativos ao ácido sulfúrico 2M (Figura 15B). Foi evidenciada uma banda entre TAG e COL, que possivelmente trata-se de diacilglicerol (DAG). Essa identificação de DAG está baseada no estudo feito com diversos lipídios e suposta posição de migração desses, de acordo com o tamanho da cadeia de cada um em placas de sílica (EJSING *et al.*, 2009).

Na fração celular da hemolinfa de *L. intermedia* além de TAG, COL e ERG revelados com ácido sulfúrico 2 M, foram evidenciadas ainda duas bandas acima do TAG que são provavelmente esteril-ésteres. Além de uma banda que possivelmente seja de ácidos graxos livres, entre a banda de TAG e a possível DAG (Figura 15B). Esta suposição está baseada nos estudos de Ejsing *et al.*, 2009. Na literatura científica, TAG, DAG e ácidos graxos já foram identificados na hemolinfa de aranha *Polybetes pythagoricus* e, sugere-se que possuem função de armazenagem lipídios para períodos de escassez energética (CUNNINGHAM *et al.*, 1994).

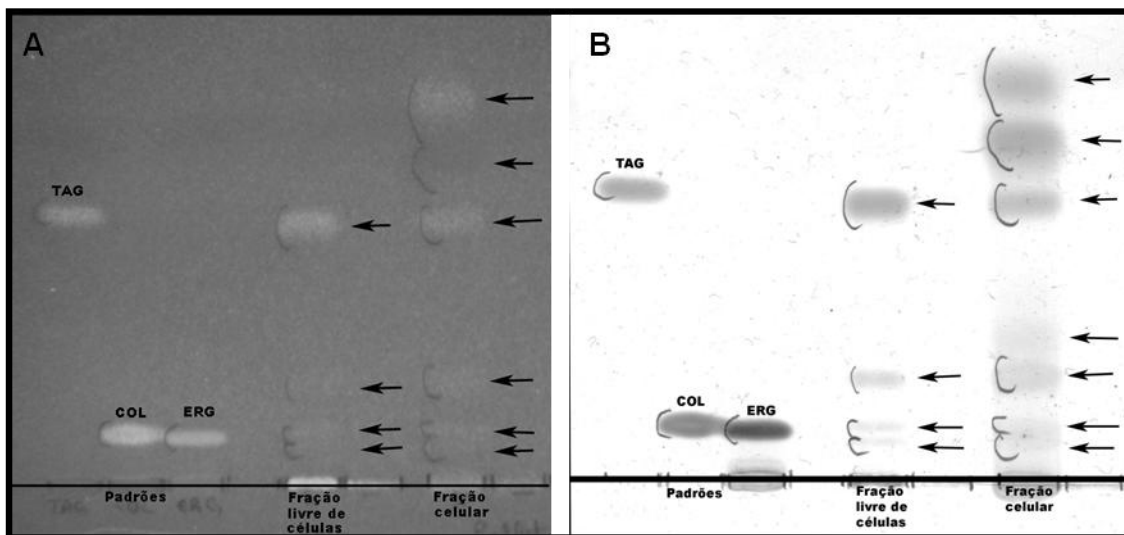


Figura 15- HPTLC das frações lipídicas da hemolinfa de *L. intermedia*, extraída por MTBE e os padrões onde TAG: triacilglicerol; COL: colesterol e ERG: ergosterol A: revelado com primulina 0,01% e B: revelado com ácido sulfúrico 2M. As setas indicam as reações positivas nas amostras.

As placas de HPTLC realizadas para detecção de glicolipídios (Figura 16) apresentaram resultados negativos para esse tipo de lipídio na hemolinfa. Na literatura não foram encontrados trabalhos que apontassem a presença de glicolipídios na hemolinfa de qualquer artrópode, muito menos o porquê dessa ausência. Era de se esperar a identificação de glicolipídios na fração celular, considerando a presença de glicocálix. Outros testes com maior quantidade de amostra foram realizados, e apenas confirmaram a inexistência de glicolipídios na hemolinfa de *L. intermedia* (dados não mostrados). O método utilizado para identificação dos carboidratos com orcinol tem alta sensibilidade, descartando a possibilidade de falta de sensibilidade do método (HASHIMOTO *et al.*, 1987).

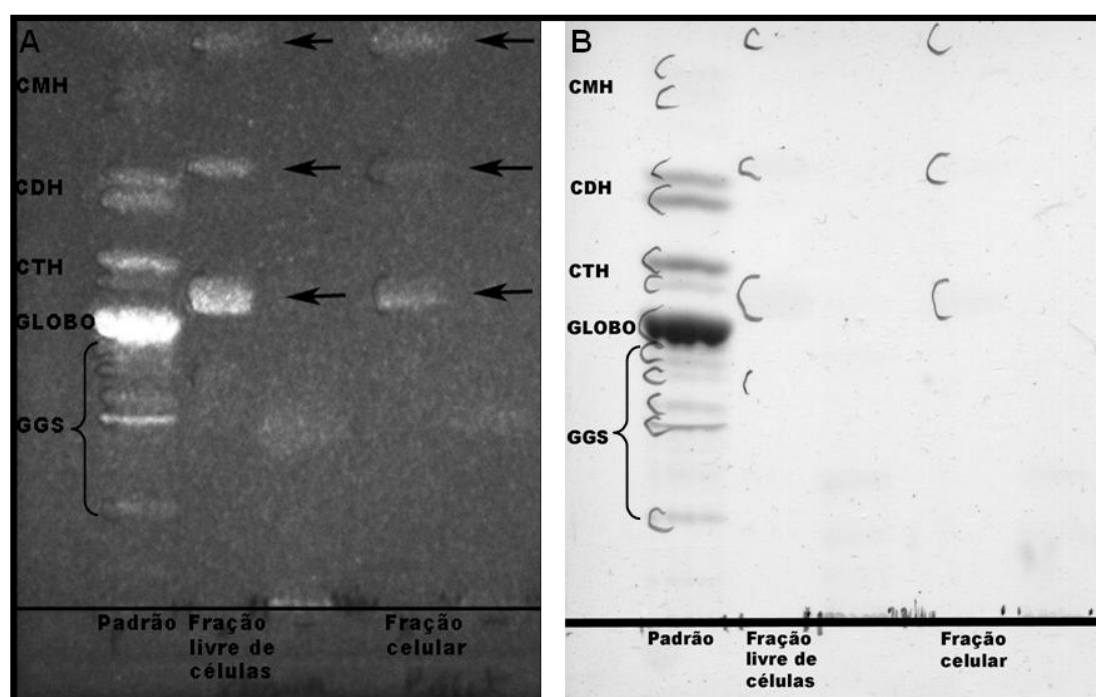


Figura 16- HPTLC das frações lipídicas da hemolinfa de *L.intermedia*, extraída por MTBE e os padrões utilizados foram CMH: ceramida monohexosil; CDH: ceramida dihexosil; CTH: ceramida trihexosil; GLOBO: globosídios; GGS: gangliosídios. A: revelado com primulina 0,01% e B: relavado com ácido sulfúrico 2M. As flechas indicam as reações positivas nas amostras.

Os estudos quantitativos das frações lipídicas da hemolinfa de *L. intermedia* estão em andamento através de análise lipidômica por espectrometria de massas, pela qual será possível confirmar a ausência de glicolipídios na hemolinfa, e identificar os outros lipídios.

Em todas as mostras há lipídios que não se descolaram do ponto de origem, são lipídios de outras classes que não tiveram sua migração favorecida pela escolha da fase móvel.

5.6 CARACTERIZAÇÕES DOS HEMÓCITOS

A identificação dos hemócitos presentes na hemolinfa de *L. intermedia* é de grande valia não somente para caracterização dessa amostra biológica e entendimento da biologia do animal, mas também devido potencial de aplicações biotecnológicas muito interessantes desses tipos celulares.

Os hemócitos participam da resposta imune inata de muitos artrópodes, estão envolvidos no reconhecimento de invasores, na fagocitose, na encapsulação e eventos de coagulação da hemolinfa (LAVINE; STRAND 2002). Além disso, os hemócitos eventualmente liberam para circulação os peptídeos antimicrobianos, que irão combater a invasão de bactérias (LAVINE; STRAND 2002; FUKUWAZA *et al.*, 2008).

Para a realização deste estudo morfológico dos hemócitos da hemolinfa de *L. intermedia*, primeiramente foi necessário estabelecer o processo mais adequado para a fixação das células. Diferentes protocolos foram realizados, e foi escolhido aquele no qual as características morfológicas das células estivessem mais bem preservadas, possibilitando sua correta identificação.

Há vários métodos de fixação dos hemócitos descritos na literatura, eles são escolhidos de acordo com o objetivo do trabalho e com a coloração que se deseja realizar posteriormente. São eles: fixação com metanol de 3-10 minutos, fixação ao ar livre em diferentes tempos, fixação com álcool e a fixação por glutaraldeído 1 ou 2%, sendo que alguns autores defendem que a fixação com formol-cálcio (Baker 10%) é a mais adequada, pois evitam a degradação das vesículas de lipídios do adipohemócito (BARRACCO *et al.*, 1987, CARNEIRO; DAEMION 1996; BRAYNER *et al.*, 2005; ARAÚJO *et al.*, 2008; CAVALCANTI *et al.*, 2012). Para a fixação dos hemócitos da hemolinfa de *L. intermedia* foram

testados vários métodos, a tabela 2 resume os resultados encontrados, para todas as variações nessa metodologia.

Nº de células	Nº de lâminas	Fixador	Coloração	Resultado
$1,5 \times 10^4$	2	Ar livre (15-30 minutos)	MGG	Número de células insuficientes apresentou células lisadas; pouco preservadas, pois ocorreu a formação de agregados celulares.
5×10^4	2	Álcool etílico: Éter etílico 1:1 (5 minutos)	MGG	Número de células satisfatório, mas a fixação ficou semelhante ao fixado no ar livre, com grumos e células lisadas; a coloração ficou melhor do que visto ao ar livre, possibilitando a diferenciação entre núcleo e citoplasma.
$2,1 \times 10^4$	2	Metanol 100% (3 minutos)	MGG	Baixo número de células; células com citoplasma e núcleo bem definidos e a coloração evidenciou bem os núcleos.
5×10^4	2	Baker formol- cálcio (12 horas)	MGG	Número de células satisfatório; células pouco preservadas; coloração azulada.
5×10^4	2	Álcool etílico 95° (5 minutos)	MGG	Número de células satisfatório; preservou melhor as células em relação aos outros fixadores, mas ainda havia agregados celulares.
5×10^4	2	Glutaraldeído (2 horas)	MGG	Número de células satisfatório; células com citoplasma e núcleo bem preservados, a coloração evidenciou principalmente os grânulos dos GLs.

Quadro 2- Resumo dos resultados vistos nas lâminas produzidas com diferentes parâmetros, para número de células, fixação e coloração. MGG: coloração de May-Grünwald, Giemsa.

Os fixadores que melhor preservaram a integridade celular foram o metanol 100% por 3 minutos e glutaraldeído 2% por 2 horas. Para dar continuidade aos estudos morfológicos optou-se pela utilização do metanol 100% que é menos tóxico que o glutaraldeído 2%. A fixação ao ar livre é muito utilizada em extensão sanguínea, porém esse método de fixação não foi eficiente para preservação dos hemócitos, pois as células apresentaram

citoplasma vacuolizado, afetando até mesmo a forma do núcleo (dados não mostrados).

Além da coloração de May-Grünwald Giemsa foi também realizada a coloração de Rosenfeld sob as mesmas condições, contudo esta coloração não permitiu a diferenciação entre núcleo e citoplasma (resultados não mostrados).

A caracterização dos hemócitos de artrópodes é baseada na comparação com as descrições morfológicas já existentes na literatura (GUPTA, 2009). Contudo, os artigos com hemócitos de aranhas e artrópodes venenosos são bastante escassos. O grupo mais próximo, filogeneticamente, dos aracnídeos são os insetos, que possuem todos os tipos celulares bem caracterizados (RUPPERT *et al.*, 2005; GUPTA, 2009). Por isso, para realizar uma caracterização fidedigna, os hemócitos de *L. intermedia* foram comparados aos hemócitos de aracnídeos e insetos disponíveis na literatura.

Há controvérsias na literatura quanto à morfologia de cada tipo de hemócito, isso muito provavelmente ocorre devido às análises terem sido realizadas em diferentes fases do desenvolvimento do animal e da célula (GUPTA, 2009). Ou ainda, não se pode descartar que os hemócitos possam simplesmente apresentar uma característica morfológica distinta em cada espécie de artrópode. O que dificulta a caracterização dos hemócitos é o fato de haver sinonímias, isso muitas vezes gera divergências nos artigos científicos (GUPTA, 2009). Esses sinônimos surgiram porque os hemócitos foram descritos por vários autores, em diferentes épocas, com objetivos distintos e considerando critérios diferentes. Portanto, para realização da caracterização dos hemócitos de *L. intermedia* utilizamos a literatura mais completa (CHAPMAN, 1982; CARNEIRO; DAEMON, 1996; FALLEIROS, 1995; ANDRADE *et al.*, 2003; OLIVEIRA, 2006; ARAÚJO *et al.*, 2008; 2009; GRUPTA, 2009).

Na hemolinfa dos artrópodes existem vários tipos de hemócitos: os pró-hemócitos, os plasmatócitos, os granulócitos, os adipohemócitos, oenocitóides, os esferulócitos, os coagulócitos entre outros (CARNEIRO; DAEMON 1996; FALLEIROS *et al.*, 2003; GULLAN; CRANSTON, 2008; GUPTA, 2009). Como os artrópodes vivem em ambientes com condições variadas, cada tipo de

hemócito pode ou não estar presente, ser abundante ou não, de acordo com o estado fisiológico e habitat em que o animal se encontra (CARNEIRO; DAEMON, 2002)

Nesse trabalho identificamos na hemolinfa de *L. intermedia* os pró-hemócitos, os plasmatócitos, e os granulócitos.

Os pró-hemócitos são pouco frequentes na hemolinfa dos artrópodes, representam menos de 5% da população total (FALLEIROS *et al.*, 2003; MANACHINI *et al.*, 2011). Na hemolinfa de *L. intermedia* os PHs são cerca de 3% dos hemócitos. Entretanto, na hemolinfa de *Aedes aegypti* eles apresentam representatividade de 20% da população total (ARAÚJO *et al.*, 2008). Os PHs são células precursoras de outros tipos de hemócitos, são geralmente pequenas (6-14 μm) e arredondadas, possuem núcleo grande, que ocupa a maior parte do citoplasma, fortemente acidófilo, na região central da célula. Seu citoplasma não apresenta granulações (CARNEIRO; DAEMON 1996, BRAYNER *et al.*, 2005; ARAÚJO *et al.*, 2008). Nesse tipo celular é observada uma baixa concentração de retículo endoplasmático, mitocôndria e complexo de Golgi (FALLEIROS, 1995; STETTLER *et al.*, 1998; GUPTA, 2009). A figura 17 mostra um PH encontrado na hemolinfa de *L. intermedia*, comparado com o desenho ilustrativo dos PHs encontrados em hemolinfa de insetos e comparado também com PHs encontrados na hemolinfa de *Aedes aegypti*. Os PHs possuem como sinônimas: proleucocito, macronucleocito e prohemocitoide (GUPTA, 2009). Essas células podem ter diversas origens (GUPTA, 2009). Para algumas ordens de insetos essas origens já foram determinadas. Como por exemplo, para as ordens hemíptera, díptera e hymenoptera já foi esclarecido que os pró-hemócitos são oriundos da mesoderme (GUPTA, 2009). Já os indivíduos da ordem lepidóptera podem ter pró-hemócitos procedente tanto da mesoderme quanto da endoderme, porém mariposas da espécie *Bombyx mori* são uma exceção, pois possuem pró-hemócitos originários do corpo gorduroso (GUPTA, 2009).

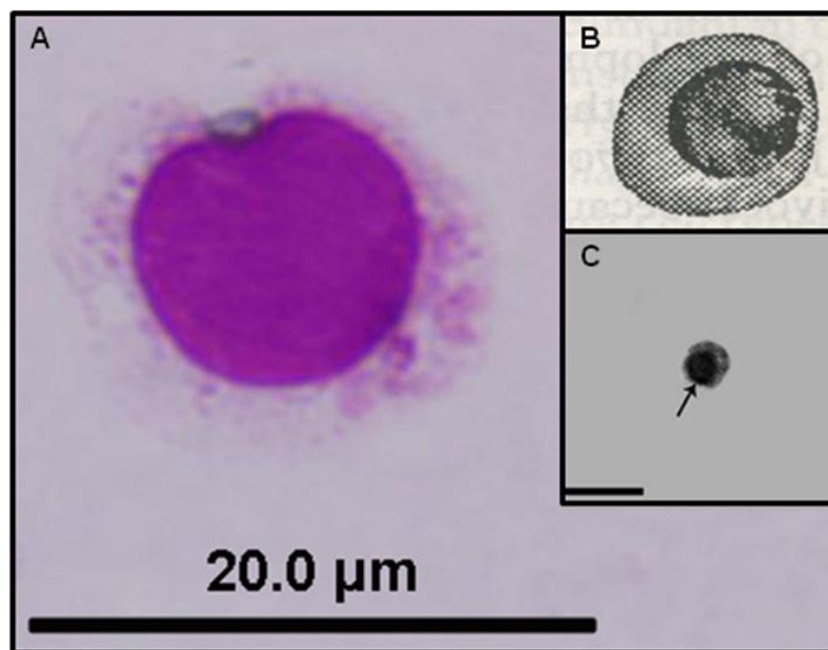


Figura 17- Pró-hemócitos. A: Pró-hemócito identificado na hemolinfa de *L. intermedia*, fixado com metanol 3 minutos e corado por May-Grünwald, Giemsa; B: Desenho ilustrativo de pró-hemócito de inseto (adaptado de CHAPMAN (1982); C: Pró-hemócito de *A. aegypti*, fixados com metanol 100% por 10 minutos e corados com Giemsa (1:9) por 15 minutos (barra equivale 10 µm)- adaptado de (ARAÚJO *et al.*, 2008).

Os plasmatócitos são células polimorfas com tamanho variado de 3.3-50 µm. Geralmente possuem o núcleo central, mas pode ocasionalmente ocorrer próximo à periferia celular, e podem apresentar mais de um núcleo (CHAPMAN, 1982; CARNEIRO; DAEMON, 1996; GUPTA, 2009). Os PLs possuem bastante citoplasma basófilo que pode ou não apresentar grânulos. Os PLs podem também apresentar filopódios e invaginações da membrana (CHAPMAN, 1982; FALLEIROS *et al.*, 2003; GUPTA, 2009). Esse tipo de hemócito está abundantemente presente na grande maioria das espécies de insetos, em mariposas da espécie *Diatraea saccharalis* representam 29% do total de hemócitos (FALLEIROS *et al.*, 2003). Na hemolinfa de *L. intermedia* essa representatividade é ainda maior, sendo cerca de 42,3% da população total de hemócitos. A figura 18 mostra um PL encontrado na hemolinfa de *L. intermedia*, comparado com o desenho ilustrativo dos PLs encontrados em insetos, comparando também com PLs encontrados na hemolinfa de *A. aegypti*. São sinônimas para plasmatócito: leucócito, fagócito, amebócito e linfócito (GUPTA, 2009).

O plasmatócito é considerado a principal célula envolvida no processo de fagocitose, demonstrado em estudos *in vitro* com hemócitos de baratas da espécie *Blaberus craniifer* (ANDERSON *et al.*, 1973) e com hemócitos da mariposa *Pseudoplusia includens* (LAVINE ; STRAND, 2002).

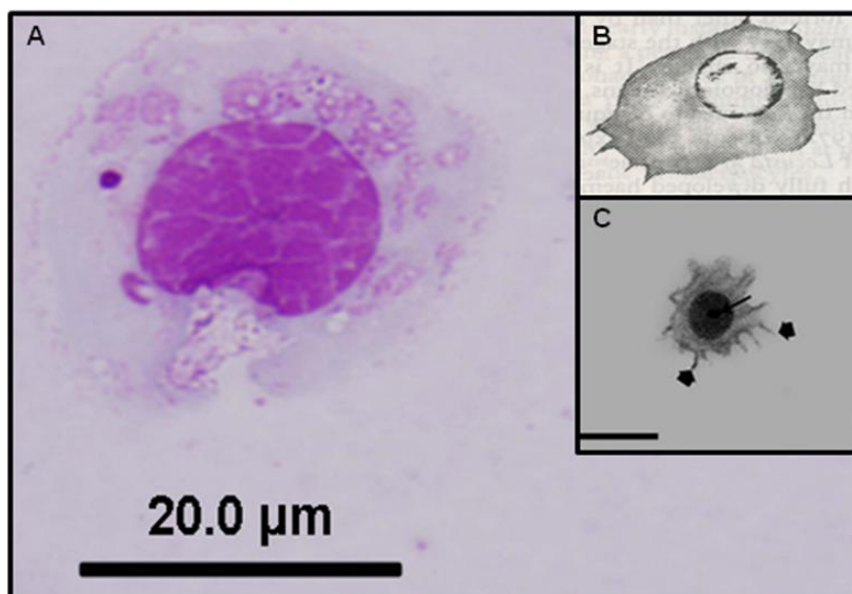


Figura 18- Plasmatócito. A: Plasmatócito identificado na hemolinfa de *L. intermedia*, fixado com metanol 3 minutos e corado por May-Grünwald, Giemsa; B: Desenho ilustrativo de plasmatócito de inseto (adaptado de CHAPMAN (1982); C: Plasmatócito de *A. aegypti*, fixados com metanol 100% por 10 minutos e corados com Giemsa (1:9) por 15 minutos (barra equivale 10 µm) - adaptado de (ARAÚJO *et al.*, 2008).

Os granulócitos são células ovais ou esféricas de tamanho variado (4-45 µm). O citoplasma pode ou não apresentar processos citoplasmáticos, como micropapilas ou filopódios (GUPTA, 2009). Geralmente o núcleo é central e relativamente pequeno se comparado ao núcleo do PL (GUPTA, 2009). Sua característica principal é possuir grânulos no citoplasma (CARNEIRO; DAEMON, 1996). Esse tipo celular possui retículo endoplasmático e complexo de Golgi bem desenvolvidos, em microscopia eletrônica de transmissão são vistas muitas vesículas de lisossomos (CHAPMAN, 1982; FALLEIROS, 1995; GUPTA, 2009). A figura 19 mostra um GL encontrado na hemolinfa de *L. intermedia*, comparado com o desenho ilustrativo dos GLs encontrados em insetos, comparado também com GLs de *A. aegypti*. A representatividade desse tipo celular na hemolinfa de *L. intermedia* foi de 23% da população total

identificada. Suas sinônimas são: amebócito, fagócitos, e células hialinas (GUPTA, 2009).

Os GLs estão envolvidos no processo de coagulação, fagocitose, formação de nódulos e encapsulação (FARALDO, 2004; ARAÚJO, 2009).

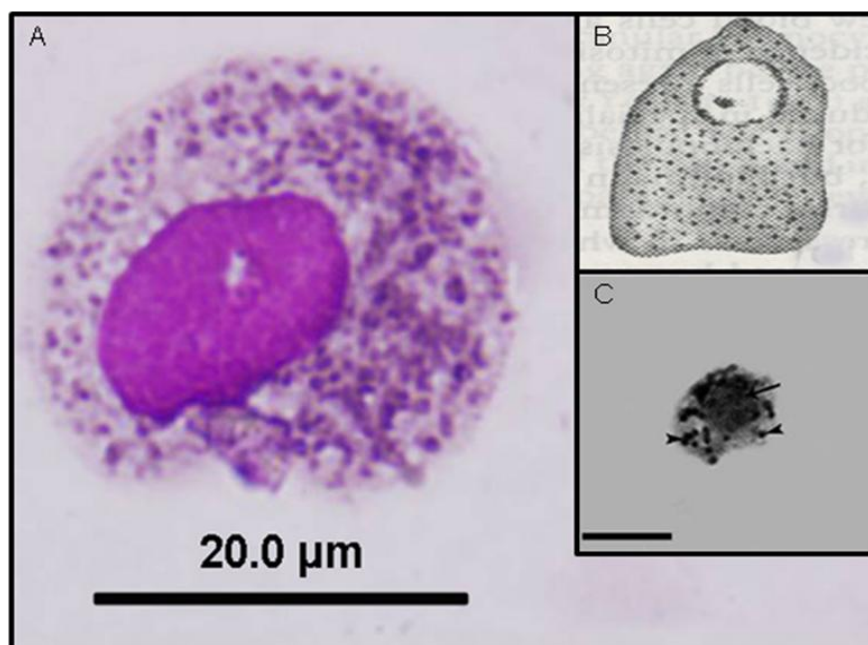


Figura 19- Granulócitos. A: Granulócito identificado na hemolinfa de *L. intermedia*, fixado com metanol 3 minutos e corado por May-Grünwald, Giemsa; B: Desenho ilustrativo de granulócito de inseto (adaptado de CHAPMAN (1982); C: Granulócito de *A. aegypti*, fixados com metanol 100% por 10 minutos e corados com Giemsa (1:9) por 15 minutos (barra equivale 10 µm) - adaptado de (ARAÚJO *et al.*, 2008).

Os pró-hemócitos, granulócitos e plasmatócitos da hemolinfa de *L. intermedia* são semelhantes aos encontrados na hemolinfa de *Aedes aegypti* (Figura 17, 18 e 19) (ARAÚJO *et al.*, 2008). O que corrobora com a identificação realizada nesse trabalho, confirmando a identidade desses tipos celulares em aranhas-marrons.

Na hemolinfa de *L. intermedia* foi observada uma célula que se encaixa tanto nas descrições de adipohemócitos como de esferulócitos (Figura 20). Para identificação desse tipo celular será realizada uma imunocitoquímica. Contudo, ambas as células, adipohemócitos e esferulócitos, são positivos na reação de PAS (reação específica para glicídeos). Por isso a discriminação desse tipo celular será realizada com a coloração específica para lipídios de

Sudan Black. É possível que os dois tipos celulares estejam presentes na hemolinfa de *L. intermedia*, sendo necessário realizar a sua diferenciação. Células com essas características representaram 31,3% da população total de hemócitos em *L. intermedia*.

Adipohemócito são células esféricas ou ovais, com tamanho variado (7-45 μm), com núcleo central e relativamente pequeno se comparado com PL. O citoplasma pode ou não apresentar filopódios e modificações citoplasmáticas, sua principal característica é possuir vesículas de lipídios, que podem ou não conter grânulos não lipídicos (Figura 20 D e E). A delimitação do citoplasma quase nunca é vista (CHAPMAN, 1982; GUPTA, 2009). Esse tipo celular representa 29% do total de hemócitos na hemolinfa de *A. aegypti* (ARAÚJO *et al.*, 2008). São sinônimos: adipo-esferulócito, adipoleucócito, esferoidócito e adipócitos (GUPTA, 2009).

Com o já discutido, a caracterização dos adipohemócitos pode ser realizada com reação citoquímica de PAS- (ácido periódico-Schiff do inglês *Periodic acid-Schiff*) que irá evidenciar os grânulos não lipídicos; ou ainda com a marcação específica para lipídios como Sudan Black ou Red (GUPTA, 2009). Geralmente os AD são confundidos com os GLs devido à presença dos grânulos não lipídicos, além disso, podem ser confundidos também com os esferulócitos, pois algumas células podem conter tantas vesículas de lipídios que tomam todo o espaço citoplasmático e deformam a célula de modo com que se assemelham com os esferulócitos.

Os esferulócitos são células ovóides ou arredondadas, com tamanho variando de 5- 25 μm , com delimitação celular pouco evidente. O núcleo é central ou excêntrico muito rico em cromatina. O citoplasma é repleto de esférulas granulares, floculantes ou filamentosas de fina textura (Figura 20 B e C) (FALLEIROS, 1995; BERGER; SLAVÍČKOVÁ, 2008; GUPTA, 2009). Além disso, são ricos em poliribossomos, complexo de Golgi e lisossomos (GUPTA, 2009). Os EFs são ricos em mucopolissacarídeo ácido ou neutro e glicoproteínas, sendo assim também apresentam reação positiva com PAS (GUPTA, 2009). São sinônimos de esferulócito: esferócito, célula eruptiva, regmatocitos e célula hialina (GUPTA, 2009).

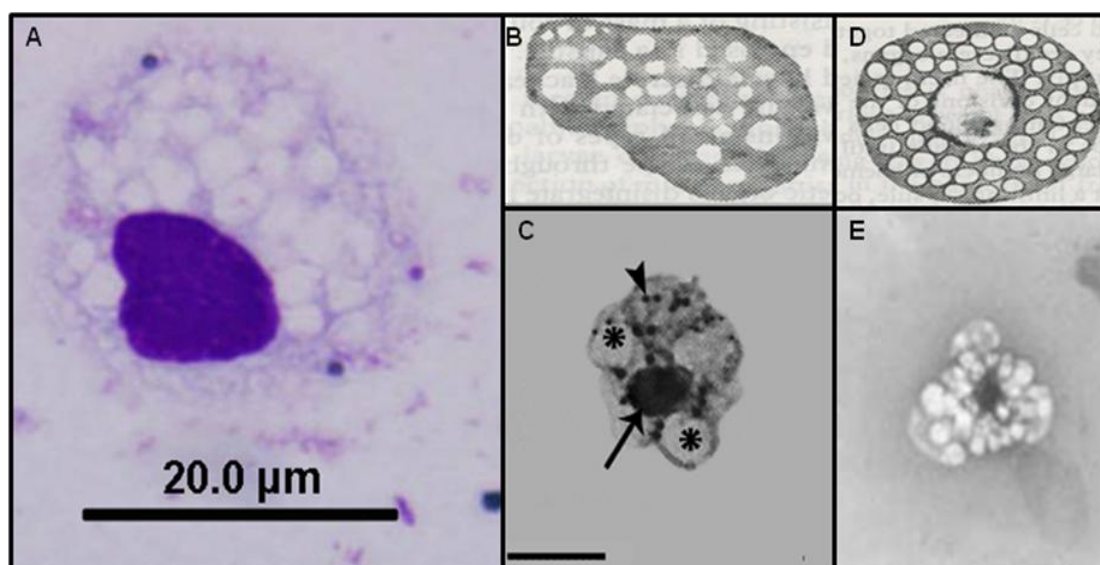


Figura 20- Adipohemócitos e esferulócitos. A: hemócito não identificado na hemolinfa de *L. intermedia*, fixado com metanol 3 minutos e corado por May-Grünwald, Giemsa; B e D: Desenhos ilustrativos de adipohemócito e esferulócito respectivamente, ambos de inseto (adaptados de CHAPMAN (1982); C: Adipohemócito de *A. aegypti*, fixados com metanol 100% por 10 minutos e corados com Giemsa (1:9) por 15 minutos (barra de 10 μ m) - adaptado de ARAÚJO *et al.*, (2008); E: Esferulócito da broca da cana-de-açúcar *Diatraea saccharalis*, fixados com metanol por 5 minutos e corados com Giemsa 5 minutos (adaptado de OLIVEIRA 2006).

Os oenocitóides são hemócitos pouco frequentes na hemolinfa dos artrópodes (GUPTA, 2009) e sua presença não foi constatada durante esse estudo com hemolinfa de *L. intermedia*.

Oenocitóide (OE) são células grandes (16- 55 μ m ou mais), podem ser esféricas, ovais ou alongadas. O citoplasma não possui micropapilas, nem filopódios, nem qualquer outra irregularidade (GUPTA, 2009). Possuem núcleo pequeno, redondo ou alongado e geralmente excêntrico, ocasionalmente podem ocorrer dois núcleos (ARAÚJO, 2009). As membranas plasmáticas e nucleares são pouco visíveis (GUPTA, 2009). Possui poucos poliribossomos, mas é abundante a quantidade de mitocôndrias, retículo endoplasmático e complexo de Golgi (GUPTA, 2009). Os OEs possuem a proteína pró-fenoloxidase no citoplasma, essa proteína é clivada em fenoloxidase para desencadear o processo de melanização nos artrópodes (LAVINE; STRAND, 2002).

Há outras maneiras de analisar a morfologia dos hemócitos, como a microscopia eletrônica de transmissão (MET) e a microscopia de contraste de

fase (AONO; MORI, 1996; CASELÍN-CASTRO *et al.*, 2008; CUNHA *et al.*, 2009). A caracterização por MET também é realizada através da comparação morfológica com os tipos celulares já descritos. Porém, pela alta definição das imagens é possível diferenciar ADs, GRs e EFs. Além disso, na maioria dos casos é necessária uma identificação complementar pela microscopia de luz (ARAÚJO *et al.*, 2008). Para identificação dos granulócitos e dos esferulócitos a técnica mais simples e adequada é o contraste de fase, pois evidencia muito bem esses tipos de hemócitos (FALLEIRO *et al.*, 2003).

A aplicação biotecnológica mais interessante ligada aos hemócitos está relacionada com a produção dos peptídeos antimicrobianos, que participam da imunidade inata de muitos artrópodes, poucas vias de liberação dessas moléculas foram identificadas em insetos e aracnídeos (LAVINE; STRAND, 2002). Por isso, identificando os hemócitos presente na hemolinfa, o estudo com os peptídeos antimicrobianos se tornará facilitado.

Geralmente os peptídeos antimicrobianos são originários dos hemócitos, a exemplo disso, Ceraul e colaboradores (2003) encontraram a *defensina*, que é um dos peptídeos antimicrobianos mais bem caracterizados dos artrópodes, em granulócitos de acaro *Dermacentor variabilis*. Fukuzawa e colaboradores (2008) mostraram que dois peptídeos antimicrobianos (*gomesin* e *acanthoscurrin*) são armazenados na forma de grânulos em 57% hemócitos na hemolinfa de aranhas da espécie *Acanthoscurria gomesiana*. Sendo a secreção desses peptídeos na hemolinfa uma das principais formas de defesa das aranhas (FUKUZAWA *et al.*, 2008). Além disso, Boman (1998) afirma que os peptídeos antimicrobianos são produzidos em duas vias: no corpo gorduroso ou por outros tecidos e em hemócitos. Contudo, nas moscas do gênero *Drosophila*, os hemócitos não parecem ser importantes na liberação dos peptídeos antimicrobianos na hemolinfa (LAVINE; STRAND, 2002). Mais estudos serão necessários para caracterização da presença e localização de peptídeos antimicrobianos na hemolinfa de *L. intermedia*.

A casualidade de uma molécula da hemolinfa ser capaz de interferir ou inibir os principais efeitos do veneno será investigada. Pois já foram descritos em outros trabalhos de hemolinfa inibidores de metaloprotease, tripsina e

quimotrisina. Essas moléculas inibidoras muitas vezes participam da resposta imune inata dos artrópodes, por isso é provável que se encontre proteínas inibidoras de proteases ou do próprio veneno na hemolinfa. Além disso, é muito possível encontrar peptídeos antimicrobianos com ações conhecidas ou não na medicina. Por isso, a espectrometria de massas do perfil proteico e a lipidômica da hemolinfa de *L. intermedia* se tornam tão interessantes para identificarmos moléculas com potenciais reais de aplicação biotecnológica.

A geração de conhecimento científico é sempre de grande valia, pois é a partir de novas informações que a ciência avança, assim como a biotecnologia, gerando ferramentas utilizáveis nas mais diversas áreas e na própria pesquisa científica.

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho foi o primeiro a estabelecer um protocolo de coleta da hemolinfa de *Loxosceles intermedia*, bem como, estudar o perfil proteico, lipídico e determinar a composição dos hemócitos.

Foi observado que perfil proteico da hemolinfa de *L. intermedia* é composta por um amplo espectro de proteínas de alta massa molecular (acima de 200 kDa) até baixa massa molecular (menores que 29 kDa), com predominância de proteínas na região de 66 kDa. Com os géis bidimensionais foi possível analisar ainda mais a complexidade do perfil proteico das proteínas totais, mostramos que as proteínas da hemolinfa de *L. intermedia* se concentram na faixa de pH 5 a 7. O perfil glicídico da hemolinda de *L. intermedia* demonstrou que as proteínas são glicosiladas com resíduos de alta manose e N-acetilgalactosamina, e assim como o veneno dessa aranha, a hemolinfa não apresentou proteínas glicosiladas com resíduos de ácido siálico nas condições testadas.

Os lipídios identificados na hemolinfa de *L. intermedia* foram colesterol, ergosterol e triaciglicerol, além disso foram identificados os fosfolipídios do tipo fosfatidilcolina, fosfatidil-inositol e fosfatidiletanolamina e não foram identificados glicolipídios. Com intuito de aprofundar os conhecimentos desses componentes, realizaremos análise lidômica das duas frações estudadas (fração livre de células e fração celular).

No presente trabalho mostramos que a hemolinfa de *L. intermedia* é composta por 3% de pró-hemócitos, 23% de granulócitos e 42,3% de plasmatócitos.

Esse trabalho foi o pioneiro no estudo da hemolinfa de *Loxosceles intermedia*. A perspectiva principal é que esse conhecimento seja capaz de fornecer informações para o entendimento não somente da biologia do animal, como servir de inspiração e cativar o estudo com a hemolinfa dos artrópodes. A possibilidade de aplicações biotecnológicas de componentes da hemolinfa e dos hemócitos é um dos principais focos da continuidade do trabalho.

REFERÊNCIAS

- ACIDENTES por animais peçonhentos. **Guia de vigilância epidemiologia**. 7. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2009.
- AROCHA-PIÑANGO, C.L.; MARVAL, E.; GUERRERO, B. *Lonomia* genus caterpillar toxins: Biochemical aspects. **Biochimie**. v. 82, p. 937–942, 2000.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia molecular da célula**. 5d. São Paulo-SP, Artmed. 2010.
- AKHUNOV, A. A.; GOLUBENKO, Z.; ABDURASHIDOVA, N. A.; MUSTAKIMOVA, E.CH.; IBRAGIMOV, F. A.; Mackessy, s. Comparative biochemistry of the physiologically active components of venom, hemolymph, and eggs of the karakurt spider (*Latrodectus tredecimguttatus*)*. **Chemistry of Natural Compounds**. v. 37, n. 6, p.562-565, 2001.
- ANDERSON, R.; HOLMES, B.; GOOD, R.A. *In vitro* bactericidal capacity of *Blaberus craniifer* hemocytes. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 22, n.1, p. 127–135, 1973.
- ANDRADE, R.M.G. ; OLIVEIRA, K.C. ; GIUSTI, A.L. ; SILVA, W.D. ; TAMBOURGI, D.V. Ontogenetic development of *Loxosceles intermedia* spider venom. **Toxicon**. v.37, p.627-632, 1999.
- ANDRADE, F.G.; NEGREIRO, M.C.C.; GREGÓRIO, E.A.; MOSCARDI, F.; FALLEIROS, A.M.F. Hemocytes of *Anticarsia gemmatilis* (Hübner) (Lepidoptera: Noctuidae) larvae: morphological and quantitative studies. **Acta Microscopica**. v.12, n.1, p. 59-64, 2003.
- ANGELO, I.C.; GÔLO, P.S.; CAMARGO, M.G.; KLUCK, G.E.G.; FOLLY, E.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Haemolymph Protein and Lipid Profile of *Rhipicephalus (Boophilus)* microplus Infected by Fungi. **Transboundary and Emerging Diseases**. v. 57, p. 79–83, 2010.
- AONO, H.; MORI, K. Interaction Between Hemocytes and Plasma Is Necessary for Hemolymph Coagulation in the Spiny Lobster, *Panulirus japonicus*. **Comparative Biochemistry and Physiology A**. v. 113, n. 3, p. 301-305, 1996.
- APPEL, M.H.; da SILVA, R.B.; GREMSKI, G.; VEIGA, S.S. Insights into brown spider and loxoscelism. **Invertebrate Survival Journal**. v. 2, p. 52-158, 2005.
- APPEL, M.H.; da SILVA R.B.; CHAIM, O.M.; PALUDO, K.S.; SILVA, D.T.; CHAVES, D.M.; da SILVA, P.H.; MANGILI, O.C.; SENFF-RIBEIRO, A.; GREMSKI, W.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Identification, cloning and functional

characterization of a novel dermonecrotic toxin (phospholipase-D) from brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Biochemical et Biophysica Acta**. v.1780, p.167- 178, 2008.

ARAÚJO, H.C.R.; CAVALCANTI, M.G.S.; SANTOS, S.S.; ALVES, L.C.; BRAYNER, F.A. Hemocytes ultrastructure of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Micron**. v.39, p. 184–189, 2008.

ARAÚJO, H.R.C. **Ultra-estrutura dos hemócitos de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)**. Dissertação de Mestrado em Ciências, Curso de Pós-Graduação em Saúde Pública do Centro de Pesquisas, Fundação Oswaldo Cruz. 2009.

ARRESE, E.L.; CANAVOSO, L.E.; JOUNI, Z.E.; PENNINGTON, J.E.; TSUCHIDA, K.; WELLS, M.A. Lipid storage and mobilization in insects: current status and future directions. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v.31, p.7–17, 2001.

ASHIDA, M.; SASAKI, T. A Target Protease Activity Of Serpins in Insect Hemolymph. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 24, n. 10, p. 1037-1041, 1994.

BARBARO, K.C.; KNYSAK, I.; MARTINS, R.; HOGAN, C.; WINKEL, K. Enzymatic characterization, antigenic cross-reactivity and neutralization of dermonecrotic activity of five *Loxosceles* spider venoms of medical importance in the Americas. **Toxicon**. v.45, p.489-499, 2005.

BARRACCO, M.A.; OLIVEIRA, R.; SCHLLEMPER JR, B. The hemocytes of *Panstrongylus megistus* (Hemiptera: Reduviidae). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.82, n.3, p. 431-438, 1987.

BAUMANN, T.; KUHN-NENTWIG, L.; LARGIADÈR, C.R.; NENTWIG, W. Expression of defensins in non-infected araneomorph spiders. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v.67, p.2643–2651, 2010.

BERGER, J.; SLAVÍČKOVÁ, K. Morphological Characterization of Hemocytes in the Adult Linden Bug, *Pyrrhocoris apterus* (L.) (Heteroptera). **Zoological Studies**. v.47, n.4, p. 466-472, 2008.

BOGAERTS, A.; BAGGERMAN, G.; VIERSTRAETE, E.; SCHOOFS, L.; VERLEYEN, P. The hemolymph proteome of the honeybee: Gel-based or gel-free?. **Proteomics**. v.9, p. 3201–3208, 2009.

BOMAN, H. G. Gene-Encoded Peptide Antibiotics and the Concept of Innate immunity: An Update Review. **Scandinavian Journal of Immunology**. v. 48, p. 15-25, 1998.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**. v.72, p.248-254, 1976.

BRECHELT, A. **O Manejo Ecológico de Pragas e Doenças**. 1ed. Santiago de Chile, Chile, Rede de Ação em Praguicidas e suas Alternativas para a América Latina (RAP-AL). 2004.

CACCIA, S.; GRIMALDI, A.; CASARTELLI, M.; FALABELLA, P.; EGUILEOR, M.; PENNACCHIO, F.; GIORDANA, B. Functional analysis of a fatty acid binding protein produced by *Aphidius ervi* teratocytes. **Journal of Insect Physiology**. v.58, p. 621–627, 2012.

CAPPELARI, F.A.; TURCATTO, A.P.; MORAIS, M.M.; DE JONG, D. Africanized honey bees more efficiently convert protein diets into hemolymph protein than do Carniolan bees (*Apis mellifera carnica*). **Genetics and Molecular Research**. v. 8, n. 4, p. 1245-1249, 2009.

CARREL, J.E. Water and hemolymph content in the wolf spider *Lycosa ceratiola* (Araneae, Lycosidae). **Journal Of Arachnology**. v. 18, p.35-40, 1990.

CASELÍN-CASTRO, S.; LLANDERAL-CÁZARES, C.; RAMÍREZ-CRUZ, A.; HERNÁNDEZ, M.S.; MÉNDEZ-MONTIEL, J.T. Morphological characterization of hemocytes from the female *Dactylopius coccus* costa (hemiptera: coccoidea: dactylopiidae). **Agrociência**. v.42, p. 349-355, 2008.

CAVALCANTI, M.G.S.; FILHO, F.C.; MENDONÇA, A.M.B.; DUARTE, G.R.; BARBOSA, C.C.G.S.; DE CASTRO, C.M.M.B.; ALVES, L.C.; BRAYNER, F.A. Morphological characterization of hemocytes from *Biomphalaria glabrata* and *Biomphalaria straminea*. **Micron**. v.43, p. 285–291, 2012.

CERAUL, S.M.; SONENSHINE, D.E.; RATZLAFF, R.E.; HYNES, W.L. An arthropod defensin expressed by the hemocytes of the American dog tick, *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 33, p. 1099–1103, 2003.

CERENIUS, L.; SÖDERHÄLL, K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. **Immunological Reviews**. v. 198, p. 116–126, 2004.

CHAIM, O.M.; SADE, Y.B.; da SILVEIRA, R.B.; TOMA, L.; KALAPOTHAKIS, E.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S.; Brown spider dermonecrotic toxin directly induces nephrotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v.221, p. 64- 77, 2006.

CHAIM, O.M.; TREVISAN, D.S.; MOREIRA, D.C.; WILLE, A.C.M.; FERRER, V.P.; MATSUBARA, F.H.; MANGILI, O.C.; SILVEIRA, R.B.; GREMSKI, L.H.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S.S. Brown Spider (*Loxosceles*

genus) Venom Toxins: Tools for Biological Purposes. **Toxins**. v.3, p.309-344, 2011a.

CHAIM, O.M.; DA SILVEIRA, R.B.; TREVISAN-SILVA, D.; FERRER, V.P.; SADE, Y.B.; BÓIA-FERREIRA, M.; GREMSKI, L.H.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; TAKAHASHI, H.K.; TOLEDO, M.S.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity. **Biochemical Biophys Acta**, v.1811, n. 2, p. 84-96, 2011b.

CHAN, Q.W.T.; HOWES, C.G.; FOSTER, L.J. Quantitative Comparison of Caste Differences in Honeybee Hemolymph. **Molecular & Cellular Proteomics**. v. 5, p.2252–2262, 2006.

CHAVES-MOREIRA, D.; SOUZA, F.N.; FOGAÇA, R.T.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; CHAIM, O.M.; VEIGA, S.S. The relationship between calcium and the metabolism of plasma membrane phospholipids in hemolysis induced by brown spider venom phospholipase-D toxin. **Journal of Cellular Biochemistry**. v.112, n. 9, p. 2529-2540, 2011.

CHAPMAN, R.F. **The Insects**. 3ed. London, Inglaterra. Hodder and Stoughton Educational. 1982.

CHRISTOFF, A.O.; OLIVEIRA, A.; CHAIM, O.M.; LUGARINI, D.; PEREIRA, A.L.B.; PALUDO, K.S.; TELLES, J.E.Q.; BRACHT, A.; VEIGA, S.S.; ACCO, A. Effects of the venom and the dermonecrotic toxin LiRecDT1 of *Loxosceles intermedia* in the rat liver. **Toxicon**. v.52, p.695-704, 2008.

COUTINHO, N. L. R. **Avaliação funcional e histopatológica das alterações renais induzidas pelo veneno da “aranha-marrom”, *L. intermedia* (Mello-Leitão, 1934)**. Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas –Biologia Celular e Molecular, Universidade Federal do Paraná., Curitiba, 1996.

CUNHA, F.M.; WANDERLEY-TEIXEIRA, V.; TEIXEIRA, A.A.C.; ALBUQUERQUE, A.C.; ALVES, L.C.; LIMA, E.A.L.A. Caracterização dos Hemócitos de Operários de *Nasutitermes coxipoensis* (Holmgren) (Isoptera: Termitidae) e Avaliação Hemocitária após Parasitismo por *Metarhizium anisopliae*. **Neotropical Entomology**. v. 38, n.2, p. 293-297, 2009.

CUNNINGHAM, M.; POLLERO, R.; GONZÁLEZ, A. Lipid circulation in spiders. Transport of phospholipids, free acid and triacylglycerols as the major lipid classes by high- density lipoprotein fraction isolated from plasma of *Polybetes pythagoricus*. **Comparative Biochemistry and Physiology B**. v.109, n.2/3, p.333- 338, 1994.

CUNNINGHAM, M.; POLLERO, R.J. Characterization of lipoprotein fractions with high content of hemocyanin in the hemolymphatic plasma of *Polybetes pythagoricus*. **The Journal Of Experimental Zoology**. v.274, p.275-280, 1996.

CUNNINGHAM, M.; GÓMEZ, C.; POLLERO, R. Lipid Binding Capacity of Spider Hemocyanin. **Journal of Experimental Zoology**. v.284, p.368–373, 1999.

CUNNINGHAM, M.; GARCIA, F.; POLLERO, R.J. Arachnid lipoproteins: Comparative aspects. **Comparative Biochemistry and Physiology C**. v. 146 p. 79–87, 2007.

CUPO, P.; AZEVEDO-MARQUES, M.M.; HERING, S.H. **Envenomation caused by poisonous animals: scorpions and spiders**. Simpósio: Urgências e Emergências Dermatológicas e Toxicológicas, Capítulo V, Ribeirão Preto-SP. v.36, p. 490-497, 2003.

DA SILVA, P.H.; SILVEIRA, R.B.; APPEL, M.H.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S. Brown spiders and loxoscelism. **Toxicon**. v. 44, p. 693-709, 2004.

DECKER, H.; HELLMANN, N.; JAENICKE, E.; LIEB, B.; MEISSNER, U.; MARKL, J. Minireview: Recent progress in hemocyanin research. **Integrative and Comparative Biology**. v. 47, n. 4, p. 631–644, 2007.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C.; **Cromatografia-um breve ensaio**. Química nova escola. n.7, 1998.

DISPONIVEL EM : Fonte: <http://araneae.hdfree.com.br/anatomiainterna.html>. Acesso: 20/03/2012, 16:45:21.

DISPONIVEL EM: <http://www.fcfar.unesp.br>. Acesso: 12/09/2012, 13:12:20.

DUNKOV, B.; GEORGIEVA, T. Insect iron binding proteins: Insights from the genomes. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v.36, p. 300–309, 2006.

DUPEJOVA, J.; STERBA, J.; VANCOVA, M.; GRUBHOFFER, L. Hemelipoglycoprotein from the ornate sheep tick, *Dermacentor marginatus*: structural and functional characterization. **Parasites & Vectors**. v.4, n. 4, 2011.

EJSING, C.S.; SAMPAIO, J.L.; SURENDRANATH,V.; DUCHOSLAV, E.; EKROOS, E.; KLEMM, R.W.; SIMONS, K.; SHEVCHENKO, A. Global analysis of the yeast lipidome by quantitative shotgun mass spectrometry. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v. 106, n.7, p. 2136–2141, 2009.

FALLEIROS, A.M.F. **Células sanguíneas de *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). Estudo citoquímico ultraestrutural e á**

microscopia eletrônica de varredura. 154p. Tese de doutorado em Anatomia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. 1995.

FALLEIROS, A.M.F.; BOMBONATO, M.T.S.; GREGÓRIO, E.A. Ultrastructural and Quantitative Studies of Hemocytes in the Sugarcane Borer, *Diatraea saccharalis* (Lepidoptera: Pyralidae). **Brazilian Archives Of Biology And Technology.** v.46, n. 2, p. 287-294, 2003.

FARALDO, A.C. **Mecanismos de defesa celular e humoral de *Chrysomya megacephala* (Diptera: Calliphoridae) contra agentes estranhos.** 102p. Tese de Doutorado em Zoologia. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista. 2004.

FEITOSA, L.; GREMSKI, W.; VEIGA, S.S.; ELIAS, M.C.Q.B.; GRANER, E.; MANGILI, O.C.; BRENTANI, R.R. Detection and characterization of metalloproteinases with gelatinolytic, fibronectinolytic and fibrinogenolytic activities in brown spider (*Loxosceles intermedia*) venom. **Toxicon.** v.36, p.1039- 1051, 1998.

FISCHER, M.L.; VASCONCELLOS-NETO, J. Microhabitats occupied by *Loxosceles intermedia* and *Loxosceles laeta* (Araneae: Sicariidae) in Curitiba, Paraná, Brazil. **Journal of Medical Entomology.** v.42, p.756-765, 2005.

FOELIX, R.F. **Biology of spiders.** Ed. Oxford University Press, New York, 2^o ed, 1996.

FOGAÇA, A. C.; ALMEIDA, I.C.; EBERLIN, M.N.; TANAKA, A.S.; BULET, P.; DAFFRE, S. Ixodidin, a novel antimicrobial peptide from the hemocytes of the cattle tick *Boophilus microplus* with inhibitory activity against serine proteinases. **Peptides.** v.27, p.667–674, 2006.

FUCHS, B.; SÜß, R.; TEUBERA, K.; EIBISCHA, M.; SCHILLER, J. Lipid analysis by thin-layer chromatography- A review of the current state. **Journal of Chromatography A.** v. 1218, p. 2754–2774, 2011.

FUKUZAWA, A.H. **Envolvimento dos hemócitos na resposta imune de aranha caranguejeira *Acanthoscurria gomesiana*.** 87p. Tese de doutorado em Ciências biomédicas, Universidade de São Paulo. 2007.

FUKUZAWA, A.H.; VELLUTINI, B.C.; LORENZINI, D.M.; SILVA JUNIOR, P.I.; MORTARAD, R.A.; SILVA, J.M.C.; DAFFRE, S. The role of hemocytes in the immunity of the spider *Acanthoscurria gomesiana*. **Developmental and Comparative Immunology.** v.32, p.716–725, 2008.

FUTRELL, J. M. Loxoscelism. **The American journal of the medical sciences.** v. 304, p.261-267, 1992.

GADWALA, M.; KARI, N.; MOGER, N.; VOOTLA, S.K. Effective Solubilization Procedure for Analysis of Silkworm Hemolymph Proteins by Two-Dimensional Gel Electrophoresis. **Applied Biochemistry and Biotechnology**. 2013. IN PRESS.

GILBERT, S.F. RAUNIO, A.M. **Embriology - Constructing the organism**. Sinauer, Sunderland, 1997.

GRECO, K.N.; MENDONÇA, R.M.Z.; MORAESA, R.H.P.; MANCINIB, D.A.P.; MENDONÇA, R.Z. Antiviral activity of the hemolymph of *Lonomia obliqua* (Lepidoptera: Saturniidae). **Antiviral Research**. v. 84, p. 84–90, 2009.

GREMSKI, L.H.; SILVEIRA, B.R.; CHAIM, O.M.; PROBST, M.C.; FERRER, V.P.; NOWATZKI, J. WEINSCHUTZ, H.C.; MADEIRA, H.M.; GREMSKI, W.; NADER, H.B.; SENFF-RIBEIRO, A.; VEIGA, S.S. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Molecular BioSystems**. v.6, n. 12, p. 2403–2416, 2010.

GULLAN, P.J. ; CRANSTON, P.S. **Os insetos, um resumo de entomologia**. Ed. Roca, São Paulo, 3° ed., 2008.

GUPTA, A.P. **Insect hemocyte**. 2009. Cambridge University Press, Cambridge- England. p.85-128, 2009.

HERAS, H.; POLLERO, R.J. Hemocyanin as an apolipoprotein in the hemolymph of the cephalopod *Octopus tehuelchus*. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1125, p.245-250, 1992.

HOGAN, C. J.; BARBARO, K. C.; WINKEL, K. Loxoscelism: Old obstacles, new directions. **Annals of emergency medicine**, v.44, p.608-624, 2004.

JAENICKE, E.; FOLL, R.; DECKER, H. Spider Hemocyanin Binds Ecdysone and 20-OH-Ecdysone. **The Journal Of Biological Chemistry**. v.274, n.48, p. 34267–34271, 1999.

JALAL, F.; MUSHTAQ, S.; PARVEZ, S.; RANA, S.A.; SUHAIL, A. Partial characterization of hemolymph of different spider species of citrus orchards. **International Journal Of Agriculture & Biology**. v.12, p. 447–450, 2010.

JIRAVANICHPAISAL, P.; LEE, B.L.; SÖDERHÄLL, K. Cell-mediated immunity in arthropods: Hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. **Immunobiology**. v. 211, p. 213–236, 2006.

KIM, E.J.; PARK, H.J.; PARK, T.H. Inhibition of apoptosis by recombinant 30K protein originating from silkworm hemolymph. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.308, p.523–528, 2003.

KUHN-NENTWIG, L. Antimicrobial and cytolytic peptides of venomous arthropods. **Cellular and Molecular Life Sciences**. v.60, p.2651–2668, 2003.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v.227, p. 680-685, 1970.

LAINO, A.; CUNNINGHAM, M.L.; GARCÍA, F.; HERAS, H. First insight into the lipid uptake, storage and mobilization in arachnids: Role of midgut diverticula and lipoproteins. **Journal of Insect Physiology**. v.55, p.1118–1124, 2009.

LAVINE, M.D.; STRAND, M.R. Insect hemocytes and their role in immunity. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 32, p.1295–1309, 2002.

LEHNINGER, A. L. ; NELSON, D. L. ; COX, M. M. **Principles of Biochemistry**. Ed. Sarvier, São Paulo, 5^oed., 2011.

MAFRA, D.G.; SILVA JUNIOR, P.I.; GALHARDO, C.S.; NASSAR, R.; DAFFRE, S.; SATO, M.N.; BORGES, M.M. The spider acylpolyamine Mygalin is a potent modulator of innate immune responses. **Cellular Immunology**.v. 275, p. 5–11, 2012.

MÁLAQUE, C.M.S.; CASTRO-VALENCIA, J.E.; CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; BARBARO, K.C.; FAN, H.W. Clinical and epidemiological features of definitive and presumed loxoscelism in São Paulo, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 44, p.139-143, 2002.

MANACHINI, B.; ARIZZA, V.; PARRINELLO, D.; PARRINELLO, N. Hemocytes of *Rhynchophorus ferrugineus* (Olivier) (Coleoptera: Curculionidae) and their response to *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.106, p.360–365, 2011.

MARANGA, L.; MENDONÇA, R.Z.; BENGALA, A.; PEIXOTO, C.C.; MORAES, R.H.P.; PEREIRA, C.A.; CARRONDO, M.J.T. Enhancement of Sf-9 Cell Growth and Longevity through Supplementation of Culture Medium with Hemolymph. **Biotechnology Progress**.v.19, p. 58-63, 2003.

MARIAPPA, D.; SAUERT, K.; MARIÑO, K.; TURNOCK, D.; WEBSTER, R.; VAN AALTEN, D.M.F.; FERGUSON, M.A.J.; MÜLLER, H. J. Protein O-GlcNAcylation Is Required for Fibroblast Growth Factor Signaling in *Drosophila*. **Science Signaling**. v. 4, n.204, p. 1-8, 2011.

MARQUES-DA-SILVA, E.; FISCHER, M.L. Distribuição das espécies do gênero *Loxosceles* Heineken & Lowe, 1835 (Araneae; Sicariidae) no Estado do Paraná. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.38, p.331-335, 2005.

MARTINS, F.J.; ANDRADE, N.S.; VIEIRA, R.C.P.A.; VIEIRA, A.A.P.; RAPOSO, N.R.B. Perfil dos acidentes causados por aranhas na área de abrangência

sanitária do município de Juiz de Fora – MG. **Revista APS**. v.14, n.3, p. 303-312, 2011.

MATYASH, V.; LIEBISCH, G.; KURZCHALIA, T.V.; SHEVCHENKO, A.; SCHWUDKE, D. Lipid extraction by methyl-tert-butyl ether for high-throughput lipidomics. **Journal of Lipid Research**. v.49, p. 1137-1146, 2008.

MOUSLI, M.; GOYFFON, M.; BILLIALD, P. Production and characterization of a bivalent single chain Fv/alkaline phosphatase conjugate specific for the hemocyanin of the scorpion *Androctonus australis*. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1425, p. 348-360, 1998.

OLIVEIRA, M.A.P. **Efeitos de *Beauveria bassiana* (bals.) vuill. e *Metarhizium anisopliae* (metsch.) sorok. sobre parâmetros biológicos e fisiológicos de *Diatraea saccharalis* f. (lepidoptera: crambidae)**. 40p. Dissertação de mestrado em Entomologia Agrícola, Universidade Federal Rural de Pernambuco. 2006.

OURTH, D.D.; RENIS, H.E. Antiviral melanization reaction of *Heliothis virescens* hemolymph against DNA and RNA viruses *in vitro*. **Comparative Biochemistry and Physiology B**. v.105, p.719–723, 1993.

PALM, W.; SAMPAIO, J.L.; BRANKATSKCH, M.; CARVALHO, M.; MAHMOUD, A.; SHEVCHENKO, A.; EATON, S. Lipoproteins in *Drosophila melanogaster*—Assembly, Function, and Influence on Tissue Lipid Composition. **PLoS Genetics**. v.8, n. 7, p. 1-18, 2012.

PALUDO, K.S. **Mecanismos envolvidos nos eventos inflamatórios induzidos pelo veneno da aranha-marrom na espécie *Loxosceles intermedia* e pela toxina dermonecrótica recombinantes–LiRecDT1**. 2008. 88p. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências) pela Universidade Federal de São Paulo, São Paulo-SP, 2008.

PLATNICK, N.I. The world spider catalog, version 11.5. American Museum of Natural History, 2008. Disponível em: <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html> acesso em: 29/11/2012.

PÉREZ-HEDO, M.; SÁNCHEZ-LÓPEZ, I.; EIZAGUIRRE, M. Comparative analysis of hemolymph proteome maps in diapausing and non-diapausing larvae of *Sesamia nonagrioides*. **Proteome Science**. v. 10, n. 58, p. 1-11, 2012

POLANOWSKI, A.; WILUSZ, T. Serine proteinase inhibitors from insect hemolymph. **Acta Bichimica Polonica**. v.43, n.3, p.445-454, 1996.

RASH, L.D.; HODGSON, W.C. Pharmacology and biochemistry of spider venoms. **Toxicon**. v.40, p. 225-254, 2002.

RAI, S.; AGGARWAL, K.K.; MITRA, B.; DAS, T.K.; BABU, C.R. Purification, characterization and immunolocalization of a novel protease inhibitor from hemolymph of tasar silkworm, *Antheraea mylitta*. **Peptides**. v. 31, p.474–481, 2010.

REISINGER, V.; EICHACKER, L.A. How to Analyze Protein Complexes by 2D Blue Native SDS-PAGE. **Practical Proteomics**. v.1, p. 6-15, 2007.

RIMOLDI, O.J.; SOULAGES, J. L.; GONZSILEZ, S.M.; PELUFFO, R.O.; BRENNER, R.R. Purification and properties of the very high density lipoprotein from the hemolymph of adult *Triatoma infestans*. **Journal of Lipid Research**. v.30, p. 857- 864, 1989.

RITDACHYENG, E.; MANABOON, M.; TOBE, S.S.; SINGTRIPOP, T. Molecular characterization and gene expression of juvenile hormone binding protein in the bamboo borer, *Omphisa fuscidentalis*. **Journal of Insect Physiology**. v.58, p.1493–1501, 2012.

ROSSI, D.C.; MUÑOZ, J.E.; CARVALHO, D.D.; BELMONTE, R.; FAINTUCH, B.; BORELLI, P.; MIRANDA, A.; TABORDA, C.P.; DAFFRE, S. Therapeutic use of a cationic antimicrobial peptide from the spider *Acanthoscurria gomesiana* in the control of experimental candidiasis. **BMC Microbiology**. v.6, p.12-28, 2012.

RUPPERT, E.E.; FOX, R.S.; BARNES, R.D. **Zoologia dos invertebrados-Uma abordagem funcional evolutiva**. Ed. Roca, São Paulo, 7° ed., 2005.

SAIDEMBERG, D.M.; BAPTISTA-SAIDEMBERG, N.B.; PALMA, M.S. Chemometric analysis of Hymenoptera toxins and defensins: A model for predicting the biological activity of novel peptides from venoms and hemolymph. **Peptides**. v.32, p. 1924–1933, 2011.

SCHENK, S.; GRAS, H.; MARKSTEINER, D.; PATASIC, L.; PROMMNITZ, B.; HOEGER, U. The *Pandinus imperator* haemolymph lipoprotein, an unusual phosphatidylserine carrying lipoprotein. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**. v. 39, p. 735–744, 2009.

SILVA JUNIOR, P.I. **Sistema imune em aracnídeos: estrutura química e atividade biológica de peptídeos antimicrobianos da hemolinfa da aranha *Acanthoscurria gomesiana***. 169 p. Tese de Doutorado (Doutorado em Ciências) pela Universidade Federal de São Paulo, São Paulo-SP, 2000.

SILVEIRA, R.B.; CHAIM, O.M.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W.; DIETRICH, C.P.; NADER, H.B.; VEIGA, S.S. Hyaluronidases in *Loxosceles intermedia* (Brown spider) venom are endo-b-N-acetyl-D-hexosaminidases hydrolases. **Toxicon**. v.49, p.758-768, 2007.

SHEWIYOA, D.H.; RISHAB, E.K.P.G.; DEJAEGHERC, B.; SMEYERS-VERBEKEC, J.; HEYDENC, Y.V.; HPTLC methods to assay active ingredients in pharmaceutical formulations: A review of the method development and validation steps. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v.66, p.11-23, 2012.

SMITH, P.K.; R. I. KROHN; G. T. HERMANSON; A. K. MALLIA; F. H. GARTNER; M. D. FROVENZANO; E. K. FUJIMOTO; N. M. GOEKE; B. J. OLSON; D. C. KLENK. Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. **Analytical Biochemistry**. v. 150 p. 76-85, 1985.

SOUZA, A.P.B.; PEIXOTO, C.C.; MARANGA, L.; CARVALHAL, A.V.; MORAES, R.H.P.; MENDONÇA, R.M.Z.; PEREIRA, C.A.; CARRONDO, M..J.T.; MENDONÇA, R. Z. Purification and Characterization of an Anti-Apoptotic Protein Isolated from *Lonomia obliqua* Hemolymph. **Biotechnology Progress**. v. 21, p. 99-105, 2005.

STETTLER, P.; TRENCZEK, T.; WYLER, T. PFISTER-WILHELM, R.; LANZREIN, B. Overview of parasitism associated effects on host haemocytes in larval parasitoids and comparison with effects of the egg-larval parasitoid *Chelonus inanitus* on its host *Spodoptera littoralis*. **Journal of Insect Physiology**. v. 44, p. 817-831, 1998.

TILLINGHAST, E.K.; TOWNLEY, M.A. Free amino acids in spider hemolymph. **Comparative Biochemistry and Physiology B**. v. 151, p. 286–295, 2008.

TOLEDO, M. S. ; LEVERY, S. B. ; STRAUS, A. H. ; TAKAHASHI, H. K. . Sphingolipids of the mycopathogen *Sporothrix schenckii*: Identification of a glycosylinositol phosphorylceramides with novel core GlcNH₂a1 2Ins motif. **FEBS Letters**. v. 493, p. 50-56, 2001.

TRABALON, M.; CARAPITO, C.; VOINOT, F.; MARTRETTE, J.M.; DORSSELAER, A.V.; GILBERT, C.; BERTILE, F. Differences in *Brachypelma albopilosa* (Theraphosidae) hemolymph proteome between subadult and adult females. **The Journal of Experimental Zoology A**. v.313, p. 651–659, 2010.

TRABALON, M. Agonistic interactions, cuticular and hemolymphatic lipid variations during the foraging period in spider females *Brachypelma albopilosa* (Theraphosidae). **Journal of Insect Physiology**. v.57, n. 6, p. 735-743, 2011.

VEIGA, S.S.; GREMSKI W.; SANTOS, V.L.P.; FEITOSA, L.; MANGILI, O.C.; NADER, H.B.; DIETRICH, C.P.; BRENTANI, R.R. Oligosaccharide residues of *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom proteins: dependence on glycosylation for dermonecrotic activity. **Toxicon**. v.37, p. 587-607, 1999.

VEIGA, A.B.G. **Caracterização molecular dos componentes do veneno de *Lonomia obliqua*: genes expressos e princípios ativos envolvidos nos distúrbios da coagulação e da fibrinólise**. 118p. Tese de doutorado

(Doutorado em Biologia Celular e Molecular) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre-RS, 2005.

VEIGA, S.S.; da SILVEIRA, R.B.; DREYFUSS, J.L.; HAOACH, J.; PEREIRA, A.M.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W. Identification of high molecular weight serineproteases in *Loxosceles intermedia* (brown spider) venom. **Toxicon**. v.38, p.825-839, 2000.

VEIGA, S.S.; FEITOSA, L.; SANTOS, V.L.P.; SOUZA, G.A.; RIBEIRO, A.S.; PORCIONATTO, M.A.; NANDER, H.B.; DIETRICH, C.P.; BRENTANI, R.R.; GREMSKI, W. Effect of Brown spider venom on basement membrane structures. **The Histochemical Journal**. v. 32, p. 397-408, 2000b.

VEIGA, S.S.; ZANETTI, V.C.; BRAZ, A.; MANGILI, O.C.; GREMSKI, W. Extracellular matrix molecules as targets for brown spider venom toxins. **Brasilian Journal of Medical and Biological Research**. v.34, p.843-850, 2001.

VETTER, R.S.; SWANSON, D.L. Loxoscelism. **Clinics in Dermatology**. v.24, p.213-221, 2006.

VETTER, R. S. ISBISTER, K.G. Medical aspects of spiders bits. **Annual review of Entomology**. v.53, p.409-429, 2008.

VETTER, R.S.; VISSCHER, P.K. Bites and stings of medically important venomous arthropods. **International journal of dermatology**. v.37, p.481-496, 1998.

VIEIRA, H. L. A.; PEREIRA, A.CP.; PEIXOTO, C.C.; MORAES, R.H.P.; ALVES, P.M.; MENDONÇA, R.Z. Improvement of recombinant protein production by an anti-apoptotic protein from hemolymph of *Lonomia obliqua*. **Cytotechnology**. v. 62, p. 547–555, 2010.

VILCINSKAS, A.; WEDDE, M. Insect Inhibitors of Metalloproteinases. **IUBMB Life**. v.54, p.339–343, 2002.

VIMR, E.R.; KALIVODA, K.A.; DESZO, E.L.; STEENBERGEN, S.M. Diversity of Microbial Sialic Acid Metabolism. **Microbiology And Molecular Biology Reviews**. v.68, n.1, p. 132–153, 2004.

WRAY,W., BOULIKAS,T., WRAY,V.P. ; HANCOCK,R. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. **Analytical Biochemistry**. v. 118, p.197-203, 1981.

WELLS, M.A., RYAN, R.O., KAWOOYA, J.K., LAW, J.H. The role of apolipoprotein III in vivo lipoprotein intercom versions in adult *Manduca sexta*. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 262, p. 4172–4176, 1987.

WEIST, S.; ERAVCI, M.; BROEDEL, O.; FUXIUS, S.; ERAVCI, S.; BAUMGARTNER, A. Results and reliability of protein quantification for two-dimensional gel electrophoresis strongly depend on the type of protein sample and the method employed. **Proteomics**. v.8, p.3389–3396, 2008.

YİĞİT, N.; BENLİ, M. The antibacterial activity of hemolymph of spider, *Agelena labyrinthica* (Araneae: Agelenidae). **Journal of Forestry Faculty**. v.8, n.2, p. 120-124, 2008.

YIN, H.; KILLEEN, K. The fundamental aspects and applications of Agilent HPLC-Chip. **Journal of Separation Science**. v. 30, p. 1427 – 1434, 2007.

YOUNG, A.R.; PINCUS, S.J. Comparison of enzymatic activity from three species of necrotising arachnids in Australia: *Loxosceles rufescens*, *Badumna insignis* and *Lampona cylindrata*. **Toxicon**. v.39, p.391-400, 2001.

ZACHARIAH, T.T.; MITCHELL, M.A.; GUICHARD, C.M.; SINGH, R.S. Hemolymph biochemistry reference ranges for wildcaught goliath birdeater spiders (*Theraphosa blondi*) and chilean rose spiders (*Grammostola rosea*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v.38, n.2, p.245–251, 2007.

ZACHARIAH, T.T.; MITCHELL, M.A. Vitamin D3 in the hemolymph of goliath birdeater spiders (*Theraphosa blondi*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**. v.40, n.2, p. 344-346, 2009.

ZORZENON, F.J. Noções Sobre As Principais Pragas Urbanas. **Biológico**. v.64, n.2, p.231-234, 2002.

ANEXO 1

AUTORIZAÇÃO DO SISBIO



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 29801-1	Data da Emissão: 11/08/2011 18:47
Dados do titular	
Nome: Silvio Sanches Veiga	CPF: 078.970.128-67
Título do Projeto: Avaliação bioquímica e biológica de toxinas toxosômicas recombinantes	
Nome da Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ	CNPJ: 75.095.679/0001-49

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	Coleta de veneno, hemolinfa e glândulas produtoras de veneno	08/2011	12/2014
2	Coleta dos espécimes de aranha-marrom	08/2011	12/2014
3	Processamento das amostras coletadas (análises qualitativas e quantitativas do veneno e hemolinfa)	09/2011	12/2014
4	Processamento das amostras coletadas (extração de RNA total das glândulas, análises qualitativas)	09/2011	12/2014
5	Desenho de oligonucleotídeos específicos para as toxinas de interesse	10/2011	12/2013
6	Obtenção das sequências completas das toxinas de interesse	10/2011	12/2013
7	Clonagem das sequências das proteínas maduras em vetor	11/2011	12/2013
8	Transfecção e Expressão das proteínas Recombinantes	12/2011	12/2014
9	Confecção de artigos científicos e apresentação de trabalhos em congressos da área	12/2011	12/2014
10	Purificação das Proteínas Recombinantes	12/2011	12/2014
11	Transformação e Expressão das proteínas Recombinantes	12/2011	12/2014
12	Análises de atividade biológica das proteínas recombinantes	02/2012	12/2014
13	Análises em Microscopia Confocal, Citometria de Fluxo e Espectropolarímetro	02/2012	12/2014
14	Imunização de animais para verificação da imunogenicidade de toxinas recombinantes	04/2012	01/2014
15	Realização de imunossaios para pesquisa de terapias racionais	04/2014	07/2014
16	Experimentos de Cristalografia das toxinas recombinantes de interesse	05/2014	12/2014
17	Análise dos dados cristalográficos	07/2014	12/2014

De acordo com o art. 33 da IN 154/2007, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto.

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passa da, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa IBAMA nº 154/2007 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licença para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES). Em caso de material consignado, consulte www.icmbio.gov.br/sisbio - menu Exportação.
5	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
6	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/gen .
7	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da Infra-estrutura da unidade.

Equipe

#	Nome	Função	CPF	Doc. Identidade	Nacionalidade
1	Andrea Benf Ribeiro	Pesquisador	024.183.219-59	36797924 SSP-PR-PR	
2	Olga Meiri Cham	Pesquisador	034.415.729-63	72178823 SSP-PR-PR	

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº154/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 45236984



Página 1/3